

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-501064

(43)公表日 平成8年(1996)2月6日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
A 61 K 38/00			
9/107	D	9455-4C	
9/16	U	9455-4C	
		9455-4C	A 61 K 37/02
		9455-4C	37/34
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平6-500317
(86) (22)出願日	平成5年(1993)5月25日
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)11月28日
(86)国際出願番号	PCT/GB93/01079
(87)国際公開番号	WO93/24150
(87)国際公開日	平成5年(1993)12月9日
(31)優先権主張番号	9211268.9
(32)優先日	1992年5月28日
(33)優先権主張国	イギリス(GB)

(71)出願人	ゼネカ・リミテッド イギリス国 ロンドン ダブリュー1ワイ 6エルエヌ, スタンホーブ ゲート 15
(72)発明者	ハッチンソン, フランシス, ゴウランド イギリス国 チェシャー ダブリューエイ 13 オーピーエル リム ウッドランズ ドライブ 29
(74)代理人	弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ペプチドとカルボキシ末端ポリエステルとの塩

(57)【要約】

本発明は、少なくとも1個の塩基性基を有するペプチドから誘導された陽イオンおよびカルボキシ末端ポリエステルから誘導された陰イオンから形成された新規の塩、このような塩の製造法、および遅延放出用の医薬品の製造へのこのような塩の使用に関する。本発明による塩は、該塩が純粋な形であるか、または遊離の結合していない形の過剰量のペプチドまたは過剰量の遊離ポリエステルとの混合物であるかに応じて、遅延放出用の医薬品の処方物の場合に有用である種々の性質を有する。

【特許請求の範囲】

1. 首記したように、少なくとも 1 個の塩基性基を有するペプチドから誘導されたカチオンおよびカルボキシ末端ポリエステルから誘導されたアニオンから形成された塩を含有するかまたは該塩からなる組成物において、該組成物が遊離ポリエステルに対する 1 つの溶剤であるがしかし遊離ペプチドのための溶剤ではない溶剤中の塩の溶液または分散液の形であり、該分散液中の塩の粒径が 5 μ m 未満、有利に 0.2 μ m 未満であるか、或いは注射または皮下移植のために微粒子または移植物の形であることを特徴とする組成物。
2. ペプチドが薬理学的に活性であり、かつオキシトシン、バソプレッシン、副腎皮質刺激ホルモン (A C T H) 、上皮増殖因子 (E G F) 、プロラクチン、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、ルリベリンまたは黄体形成ホルモン放出ホルモン (L H R H) 、インシュリン、ソマトスタチン、グルカゴン、インターフェロン、ガストリン、テトラガストリン、ペントガストリン、ウロガストロン、セクレチン、カルシトニン、エンケファリン、エンドルフィン、キョートルフィン、タフトシン、チモポイエチン、チモシン、チモスチムリン、胸腺体液性因子、血清胸腺因子、腫瘍壞死因子、コロニー刺激因子、モチリ
- ン、ポンペシン、ジノルフィン、ニューロテンシン、セルレイン、ブラジキニン、ウロキナーゼ、カリクレイン、サブスタンス P の類縁物およびアンタゴニスト、アンギオテンシン、神経成長因子、血液凝固因子 V I I および I X 、リゾチームクロリド、レニン、ブラジキニン、チロシン、グラミシジン、成長ホルモン、メラミン刺激ホルモン、チロイドホルモン放出ホルモン、チロイド刺激ホルモン、パラチロイドホルモン、パンクレオザイミン、コレシストキニン、ヒト胎盤性ラクトゲン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、タンパク質合成刺激ペプチド、胃抑制ペプチド、血管作動性腸ペプチド、血小板由来成長因子、成長ホルモン放出因子、骨形態形成タンパク質、ならびにこれらの合成類縁物および変性物および薬理学的に活性のフラグメントから選択されたものである、請求項 1 記載の組成物。
3. ペプチドが薬理学的に不活性であり、かつポリアルギニン、ポリリシンおよ

びポリ（アルギニンーコーリシン）、D-、L-またはDL-形の中性アミノ酸とD-、L-またはラセミ形のアルギニンおよび／またはリシンとの（コ）ポリマー、或いはペプチド鎖がN-末端で塩基性によって全体的または部分的に末端にありかつ骨格が中性アミノ酸残基からなるペプチドまたは（コ）ポリペプチドから選択されたものである、請求項1記載の組成物。

4. ポリエステルがヒドロキシ酸から誘導されたものならびにジオールおよび／またはポリオールとジカルボン酸および／またはポリカルボン酸との重縮合により誘導されたものから選択された、請求項1記載の組成物。

5. 請求項1記載の溶液または分散液を製造する方法において、

(a) 遊離塩基の形または塩の形の少なくとも1つの塩基性アミノ酸を弱酸およびカルボキシ末端ポリエステルと一緒に含有するペプチドを双方が可溶性である中性の極性溶剤に溶解し、溶剤または溶剤の大部分を除去し、残留する濃厚な溶液を過剰量のペプチドーポリエステル塩のための非溶剤に添加するか、または

(b) 遊離塩基の形または塩の形の少なくとも1つの塩基性アミノ酸を弱酸およびカルボキシ末端ポリエステルと一緒に含有するペプチドを双方が可溶性でありかつ凍結乾燥によって除去することができる溶剤に溶解し、生じる溶液を高速で凍結させ、生じる凍結混合物を凍結乾燥させ、生じる混合物をポリエステル成分のための溶剤中に分散させ、この混合物をペプチドーポリエステル塩が形成されるように溶解させるか、または

(c) 少なくとも1つの塩基性アミノ酸を含有するペプチドを塩の形で強酸と反応させ、この場合ポリ

エステルの幾つかまたは全部は、適当なアルカリ金属またはアルカリ土類金属とのカルボン酸塩の形であることを特徴とする、請求項1記載の溶液または分散液の製造法。

6. ペプチド薬の遅延放出のために薬理学的に活性のペプチドを有する請求項1記載の組成物において、該組成物が製薬学的に認容性の注射用ビヒクル中に懸濁された直径0.2μm～500μmの微粒子の形であることを特徴とする、請求

項1記載の組成物。

7. 注射用ビヒクルが水性であるかまたは有機性ビヒクルであり、このビヒクルが使用されるビヒクルにとって非溶剤であるかまたは高度に親脂肪性ポリエステルのためには親脂肪性有機性の注射用ビヒクルである、請求項6記載の組成物。

8. ペプチド薬の遅延放出のために薬理学的に活性のペプチドを有する請求項1記載の組成物において、該組成物が製薬学的に認容性の溶液の形で、

(a) ポリエステルとの塩の形であり、該塩が塩基性ペプチドのカチオンおよびカルボキシ末端ポリエステルのアニオンを有するポリエステルとの塩の形である少なくとも300ダルトンの分子量を有する前記の定義したような少なくとも1つの塩基性アミノ酸を含有するペプチド薬、

(b) 遊離ポリエステルのための溶剤であるが、しかし遊離ペプチドの溶剤ではない溶剤、

(c) 過剰量の溶剤、および場合によっては

(d) 溶解されたかまたはコロイド状で分散された遊離形の幾つかのペプチドを有することを特徴とする、請求項1記載の組成物。

9. 塩基性ペプチド薬がブセレリン（[D-Ser(Bu^t)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - LHRH (1-9) NHEt）、デスロレイン（[D-Trp⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - LHRH (1-9) NHEt）、フェルチレリン（[des-Gly-NH₂¹⁰] - LHRH (1-9) NHEt）、ゴセレリン（[D-Ser(Bu^t)⁶, Arg¹⁰] - LHRH）、ヒストレリン（[D-His(Bz)¹)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - LHRH (1-9) NHEt）、ロイプロレリン（[D-Leu⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - LHRH (1-9) NHEt）、ルトレリン（[D-Trp⁶, MeLeu⁷, des-Gly-NH₂¹⁰] - LHRH (1-9) NHEt）、ナファレリン（[D-Nal⁶] - LHRH）、トリプトレリン（[D-Trp⁶] - LHRH）およびその薬理学的に活性の塩から選択された黄体形成ホルモン放出ホルモンの合成類縁物である、請求項8記載の組成物。

10. 溶剤が安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール、エチルラクテート、トリ

酢酸グリセリル、クエン酸エステル、ならびに低分子量（<1000）ポリエ

チレングリコール、アルコキシポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールアセテートから選択されたものである、請求項8記載の組成物。

11. 塩基性ペプチド薬-ポリエステル塩対遊離ポリエステルの比が1:0~0.1:1.0である、請求項8記載の組成物。

12. 全固体対溶剤の比が2w/v%~40w/v%である、請求項8記載の組成物。

13. 請求項8記載の医薬組成物の製造法において、

(a) ペプチド薬とポリエステルとの緊密な混合物を製薬学的に相容性の溶剤に溶解するか；または

(b) C₁~C₆アルカノール中のペプチド薬の溶液を注射に適当な溶剤中のポリエステルの溶液に徐々に添加し、その後に出発ペプチド溶液中の溶剤が注射のために製薬学的に相容性でない場合には、該溶剤を除去することを特徴とする、請求項8記載の医薬組成物の製造法。

【発明の詳細な説明】

ペプチドとカルボキシ末端ポリエステルとの塩

本発明は、少なくとも1個の塩基性基を含有するペプチドから誘導されたカチオンおよびカルボキシ末端ポリエステルから誘導されたアニオンからなる新規の塩、このような塩の製法および遅延放出医薬組成物の製造におけるこのような塩の使用に関する。本発明の塩は、その塩が純粹形であろうと、またはその遊離した非結合形のペプチドの過剰かまたは遊離ポリエステルの過剰との混合物であろうと、遅延放出医薬組成物の処方において有効である種々の特性を有する。このような塩は両親媒性であり、その際、一部は親水性および疎油性であるペプチドからなり、かつ一部は疎水性および親油性であるポリエステルからなる。

「ペプチド」という用語は、ここでは、通常一般的に「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」と称されるポリ(アミノ酸)を包含する、一般的な意味で使用され；かつ「塩基性ペプチド」は、天然状態で塩基性であるペプチドであり、これは、過剰の塩基性アミノ酸、例えばアルギニン又はリジンの存在から生じるか、またはペプチドのN末端または単に少なくとも1個の塩基性基を含有するペプチドから、場合により1個以上の酸性アミノ酸基の存在下で生じる。

この用語は、ペプチドの合成類縁物、塩基性官能価または他の任意の形の誘導された塩基性度を有する非天然アミノ酸も包含する。「ポリエステル」なる語を、以後、カルボキシー末端ポリエステルを表すために使用する。

欧洲特許第58481号明細書は、ポリエステルの末端カルボン酸基とペプチド内の塩基性基との間の特異な化学的相互作用の可能性をほのめかしている。ローター等(Lawter et al)、Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 14, 19, (1987)およびオカダ等(Okada et al)、Pharmaceutical Research, 8, 584-587(1991)も、この可能性を記載しているが、これらの文献は、このような特異なペプチド-ポリエステル塩を全く特に記載しておらず、このような塩がどのようにして製造されうるかという記載をしておらず、かつ医薬組成物の製造においてこのような塩を使用することにより生じうる有益な効果に関する記載がないという点で推

論的である。

しかしながら、本発明によれば、冒頭で述べたように、少なくとも1個の塩基性基を有するペプチドから誘導されるカチオンおよびカルボキシ末端ポリエステルから誘導されるアニオンから形成される塩を含有するかまたはそれからなる組成物が提供され；組成物は、溶剤中の塩の溶液または分散液の形で存在し、溶剤は、遊離ポリエステルのための溶剤であるが、遊離ペプチ

ドのための溶剤ではなく、前記分散液中の塩の粒径は、 $5\text{ }\mu\text{m}$ より小さく、かつ有利には $0.2\text{ }\mu\text{m}$ より小さく；または注射または皮下内移植のための微粒子または移植物の形で存在する。

塩のカチオン成分は、薬理学的に活性である塩基性ペプチドまたは薬理学的に不活性である塩基性ペプチドから誘導される。塩基性ペプチドが薬理学的に活性である場合、本発明の塩は、それ自体、遅延放出医薬処方物中に処方される。塩基性ペプチドが薬理学的に不活性である場合、本発明の塩は、天然状態で酸性であるか（過剰の酸性アミノ酸、例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸からなる）または天然状態で中性である他の薬理学的に活性のペプチドの遅延放出組成物の処方における賦形剤として使用される。

ペプチドの遅延放出処方物における、もう一つの要求は、もちろん、ペプチドが、意図された放出の期間にわたり処方物中で十分に安定であることである。「十分に安定」とは、薬物を完全に不溶性にさせないか、または処方物に関して意図された使用の期間に、薬理学的活性の完全な損失を伴って変性しないことを意味する。

適当な薬理学的に活性なペプチドは、少なくとも 300 Da 、有利には少なくとも 800 Da 分子量を有する。意図された放出の期間にわたって、遅延放出処方物中で十分に安定であり、かつそれ故に本発明の組

成物で使用されるこのようなペプチドの例は、次のものである；オキシトシン、バソプレッシン、副腎皮質刺激ホルモン（A C T H）、上皮増殖因子（E G F）、プロラクチン、黄体形成ホルモン、滤胞刺激ホルモン、ルリベリンまたは黄体

形成ホルモン放出ホルモン (L H R H) 、インシュリン、ソマトスタチン、グルカゴン、インターフェロン、ガストリン、テトラガストリン、ペントガストリン、ウロガストロン、セクレチン、カルシトニン、エンケファリン、エンドルフィン、キヨートルフィン、タフトシン、チモポエチン、チモシン、チモスチムリン (thymostimulin)、胸腺体液性因子、血清胸腺因子、腫瘍壞死因子、コロニー刺激因子、モチリン、ボンベシン、ジノルフィン (dinorphin)、ニューロテンシン、セルレイン、ブラシキニン、ウロキナーゼ、カリクレイン、サブスタンスP類縁物およびアンタゴニスト、アンギオテンシン I I 、神経成長因子、血液凝固因子V I I およびIX、リゾチームクロリド、レニン、プラジキニン、チロシジン、グラミシジン、成長ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、甲状腺ホルモン放出ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、副甲状腺ホルモン、パンクレオザイミン、コレシストキニン、ヒト胎盤性ラクトゲン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、タンパク質合成刺激ペプチド、ガストリックインヒビトリーペプチド、バソアクティブインテスティナルペプチド、血小板由来増殖因子、成長ホルモ

ン放出因子、骨形態形成タンパク質 (bone morphogenic protein) および合成類縁物および変性物および薬理学的に活性のそのフラグメント。

本発明の組成物の有利なペプチド成分は、L H R Hの合成類縁物であり、かつ特にこのような類縁物は、これに限定されないが次のものを包含する；ブセレリン (buserelin) ([D-Ser(Bu^t)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - L H R H (1-9) N H E t) 、デスロレリン (deslorelin) ([D-Trp⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - L H R H (1-9) N H E t) 、フェルチレリン (fertirelin) ([des-Gly-NH₂¹⁰] - L H R H (1-9) N H E t) 、ゴセレリン (gosereelin) ([D-Ser(Bu^t)⁶, AzgIy¹⁰] - L H R H) 、ヒストレリン ([D-His(BzI)⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - L H R H (1-9) N H E t) 、ロイプロレリン (leuprorelin) ([D-Leu⁶, des-Gly-NH₂¹⁰] - L H R H (1-9) N H E t) 、ルトレリン (lutrelin) ([D-Trp⁶, MeLeu⁷, des-Gly-NH₂¹⁰] - L H R H (1-9) N H E t) 、ナファレリン (nafarelin) ([D-Nal⁶] - L H R H) 、トリ

プトレリン(tryptorelin) ([D-T_nP⁶] - LHRH) および薬理学的に活性のその塩。

本発明の塩において使用される、適當な薬理学的に不活性な塩基性ペプチドは、次のものである；ポリア

ルギニン、ポリリジンおよびポリ（アルギニンーコーリジン）、D-、L-またはDL-形の中性アミノ酸とD-、L-またはラセミ形のアルギニンおよび／またはリジンとの（コ-）ポリマー、ペプチド鎖が完全にまたは部分的に、塩基性基により、N-末端で終結し、かつ骨格が中性アミノ酸残基からなるペプチドまたは（コ-）ポリペプチド。

本発明の塩においてアニオン源として使用したカルボキシ末端ポリエステルは、ホモポリエステルまたはコ-ポリエステルである。有利なこのようなポリエステルは、筋内または皮下組織中で見られるような水性生理学的環境において、低分子量水溶性フラグメントへと崩壊または腐食するものである。この環境において、崩壊の主な方法は、低分子量ホモまたはコ-ポリエステルフラグメントおよび最終的には適用の部位からの処方物の消失をまねく、エステル基の加水分解的分離を包含する単純バルク加水分解(simple bulk hydrolysis)である。しかしながら、これらの注射または内移植部位において、リビング組織中の他の部位におけるのと同様に、他の崩壊メカニズムが、酵素により媒介されるようなものを包含することが認められる。

適當なホモおよびコ-ポリエステルは、ヒドロキシ酸から由来されるもの、またはジオールおよび／またはポリオール、例えば（これに限定されないが）ポ

リエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、2～10Cアルキレングリコール、グリセロール、トリメチロールプロパンおよび多官能性アルコールのポリオキシエチレート形、例えばグリセロール、トリメチロールプロパンおよび糖と、ジカルボン酸および／またはポリカルボン酸、例えば（これに限定されないが）（1～10Cアルカン）ジカルボン酸、特にマロン酸、コハク酸およびグルタル酸、フタル酸、メリト酸、ピロメリト酸とを、場合により、ヒドロキシ酸お

より／またはモノーオールの存在下で重縮合することから誘導されるものである。

ヒドロキシ酸を基礎とするホモーおよびコーポリエステルを製造する有利な方法は、環状酸二量体の開環重合によるか、またはヒドロキシ酸またはヒドロキシ酸の混合物、またはこのようなヒドロキシ酸から誘導されたラクトンの直接重合または共重合による。開環タイプまたは共重合タイプの双方のこれらの重合は、有利には、得られるホモーまたはコーポリエステルが完全にまたは一部カルボン酸官能価を有するポリマー鎖を含有するようにして実施される。従って、酸二量体の開環縮合は、適当なポリマー連鎖移動剤または得られるホモーまたはコーポリエステルの分子量および構造の双方を制御する共一開始剤の存在下で実施される。適当なこのような連鎖移動剤は、水、ヒドロキシカルボン酸、モノカルボン酸、ジカルボン酸およびポ

リカルボン酸である。

重縮合または共重縮合により製造されるポリエステルのために、重合は、過剰のカルボン酸官能価が使用され、すなわち、 $[-\text{COOH}]$ 対 $[-\text{OH}]$ の比が 1 または 1 以上であるという条件下で実施される。重縮合物の構造および分子量は、使用したアルコール（モノーオール、ジオールまたはポリオールまたは混合物）の性質、使用した酸（モノー、ジーまたはポリーカルボン酸または混合物）の性質および使用した過剰のカルボン酸の量により決定される。クレブス回路中に含まれる酸は、特に有効である。

本発明でホモーまたはコーポリエステルを製造するために有効に使用される適当なヒドロキシ酸またはラクトンの例は、次のものを包含する； β -プロピオノラクトン、 β -ブチロラクトン、 γ -ブチロラクトンおよびピバロラクトンおよび α -ヒドロキシ酪酸、 α -ヒドロキシイソ酪酸、 α -ヒドロキシ吉草酸、 α -ヒドロキシイソ吉草酸、 α -ヒドロキシカプロン酸、 α -ヒドロキシイソカプロン酸、 α -ヒドロキシ- β -メチル吉草酸、 α -ヒドロキシヘプタン酸、 α -ヒドロキシデカン酸、 α -ヒドロキシミリスチン酸および α -ヒドロキシステアリン酸。有利なこのようなホモーおよびコーポリエステルは、D-、L-またはD

L-形の乳酸およびグリコール酸、または相当する二量体ラクチドおよびグリコリドから誘導されるもので

あり、かつ有利な場合による連鎖停止剤は乳酸である。

高分子の塩基性ペプチド薬は、完全または一部、ポリマーカチオンとして存在しえ、かつポリエステルは、完全または一部、ポリマーアニオンとして存在しうるが、混合の慣例の方法を用いるかまたは有機溶剤を用いるこのようなポリマー種間の酸-塩基相互作用から生じる塩形成は、非常に困難かまたは不可能でさえある。例えば、2種の成分を混合する融成物は不適当である。それというのも、ペプチドは通常融解せず、むしろ、ポリマーを融解するために通常使用される高温で分解してしまうことが知られているからである。しかしながら、ペプチドが融解される（これは融解しない）場合でさえ、次のような熱力学的理由で、ホモーまたはコーポリエステルと非相容性であるかまたはその中に不溶性である。

ペプチドは高分子であり、従って、慣例のポリマーの典型的特性の多くを有する。従って、二種の異なるポリマータイプの混合の自由エネルギーが非常にプラスであり、かつ従って熱力学的に好適ではないので、ペプチドは、（特異な化学的または物理学的相互作用の不存在下で）異なる化学的およびポリマー骨格構造を有する他の高分子と完全に非相容性であるかまたはその中に不溶性である。バルク状態において、ペプチドは非常に極性であり、強く水素結合した分子は、その結果、ペプチドとホモーまたはコーポリエステル

（これらは、相対的に無極性であり、この中の水素結合はないかまたは弱い）との混合のエンタルピーが非常にプラスになる；これは、吸熱的および熱力学的に適当でない。更に、高分子は、限定により大きく、かつ従って低い固有エントロピーを有し、結果として、2つの異なる高分子種の混合のエントロピーが非常に低いかまたはマイナスにすらなる（例えば、P J Flory, "Principles of Polymer Chemistry", Cornell University, 1953, 555; L Bohn, "Polymer Handbook", 2nd Edition, Wiley 1975, III-211; および L Bohn, Rubber Chemistry and Technology, 1953, 26, 111-120）。

chnology, 1966, 493参照)。従って、融解状態の高温でのペプチドとポリエスチルとの混合は、塩形成を生じるために必要な分子寸法(molecular scale)で混合を生じない。ペプチドとポリエスチルの単純混合物は、塩形成を生じない。

ペプチドが溶剤中でいくらかの溶解性または膨潤可能性を有しない限り、同様の困難が、有機溶剤を用いてペプチドおよびポリエスチルの塩を形成する試みで存在する。ポリエスチルおよびペプチドの溶解特性は、非常に異なっている。ペプチドを溶かす溶剤、例えば水は、ポリエスチルのための完全な非溶剤であり；かつ、一般的に、ポリエスチルのための良好な溶剤、例えばジクロロメタンは、ペプチドのための完全な非溶剤である。ペプチドおよびポリエスチルの双方を溶かしうるような溶剤、例えばジメチルスルホキシド、ジ

メチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドおよびN-メチルピロリドンは異なる問題を有する。それというのも、これらは、相対的に不揮発性であり、高い沸点を有し、かつ従って除去するのが非常に困難であるからであり、かつまた、これらの溶剤のいくつかの非相容性の毒性故である。揮発性であり、かつ毒生物学的に認容性である、双方の成分のための一定の溶剤を同定することも可能になっているが、このような溶剤には別の困難が存在している。例えば、酢酸は、ペプチドおよびポリエスチルの双方のための溶剤であるが、多量の酸溶剤は、ペプチドをアセテート塩として存在させ(質量作用効果故に)、従って、室温(すなわち20~25℃)で、または凍結乾燥による酢酸の除去は、結果として、ペプチドおよびポリエスチルの相分離を生じ、従って、得ようとする塩形成は生じない傾向がある。

従って、本発明の課題は、塩基性ペプチドのカチオンおよびカルボキシ末端ポリエスチルのアニオンからなる塩の製法を提供することである。

本発明のペプチド-ポリエスチル塩の製造は、カルボン酸基を有するホモーまたはコ-ポリエスチルおよび、塩基性残基が遊離塩基としてまたは弱酸、有利には揮発性酸(その際、酸は 10^{-3} より小さい酸解離定数または3より大きいpK_a($pK_a = -10 \log K_a$ 、ここでK_aは酸解離定数である)を有する)の塩とし

て生じるペプチドを用いて実施することができる。特に有利なこのような塩基性ペプチド塩は、酢酸との塩である。しかしながら、2つの高分子種の固有の非相容性故に、有利には、これらのペプチドーポリエステル塩が発生しうる条件を使用すべきである。

これを達成するための一つの方法は、溶液を形成するために、ペプチドおよびポリエステルの双方を溶かす溶剤を使用することであり、この溶液からは溶剤を直接除去することができ、その際、第一に両親媒性の塩が残るか、または第二にペプチドおよびポリエステルの混合物が、更に加工した場合に両親媒性の塩を形成するように前処理される物理状態で残る。

第一のアプローチの例は、溶剤、例えば、これに限定されないジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドおよびN-メチルピロリドンを使用することであり、これらは、実質的に中性であり、ペプチドおよびポリエステルの双方のための溶剤であってよい。前記したような標準環境下で、これらの溶剤は、その高い沸点および相対的不揮発性により、除去することが非常に困難である。ペプチド（例えばアセテート塩としての）およびポリエステルがこれらの溶剤のいずれか一つに溶ける場合、ポリエステル中の強い酸性の乳酸またはグリコール酸基が弱いカルボン酸に代わるので、ペプチドは、ポリエステルとの塩として存在する傾向がある。溶剤および遊離

した酢酸（または他の弱いが揮発性のカルボン酸）のバルクを真空中で除去し、かつペプチドーポリエステル塩を含有する残留溶液を蒸留水に添加し、不溶性ポリマー塩を沈殿させる。

蒸留水は、有利には、ポリエステルアニオンの置換によるカルボネート塩の形成を阻害する二酸化炭素を有しない。次いで、ペプチドーポリエステル塩中の残留溶剤を、有利には二酸化炭素不含の水で更に洗浄することにより除去する。いくつかの環境において、ポリマー塩は、溶剤を除去する必要なしに水中への直接沈殿により単離され、かつこのアプローチは、ペプチドが塩基として使用される場合に特に有効である。

従って、本発明の他の一様によれば、遊離塩基の形または弱酸、例えば酢酸

との塩の形の塩基性ペプチドおよびカルボキシ末端ポリエステルを、双方が溶ける中性の極性溶剤中に溶かし、溶剤または溶剤のほとんどを除去し、かつ残留する濃縮溶液をペプチドーポリエステル塩のための過剰の非溶剤に添加することによる、塩基性ペプチドおよびカルボキシ末端ポリエステルからなる塩の製法が提供される。

ペプチドおよびポリエステルの双方を溶かす溶剤を用いることを基礎とする第二のアプローチは、前記溶剤が凍結および慣例の凍結乾燥または噴霧乾燥により除去することができることによるものである。この方法の実質的な部分は、非常に迅速な、ほとんど瞬間的

な速度で、かつ有利にはポリエステルおよびペプチドのガラス転位温度より下である温度で、ペプチドーポリエステルから溶剤を除去することである。この場合、溶剤は中性または酸性であってよく、かつ有利な溶剤は酢酸である。

ある程度の粘性流または粘弾性特性を示す溶液からの溶剤のこのような非常に迅速な除去は、結果として、小さなコロイド状寸法で発生する2つの非相容性高分子タイプの相分離を生じる。すなわち、得られるペプチドーポリエステル混合物は、非常に高い表面積および表面エネルギーを有する。結論として、通常、ペプチドのための非溶剤であるポリエステルのためのもう一つの異なる溶剤を、実質的に溶剤不含のこのタイプのペプチドーポリエステル混合物に加える場合、高い表面エネルギーが、塩形成およびポリエステル中のペプチドのコロイドの性質の消滅により散逸する。この第2のアプローチのために適当な溶剤は、凍結乾燥可能であるべきであり、かつこれに限定されないが、酢酸、ジオキサン／水混合物およびt-ブタノール／水混合物を包含するか、または噴霧乾燥可能であるべきである。

従って、本発明のもう一つの態様により、塩基の形または弱酸、例えば酢酸との塩の形の塩基性ペプチドおよびカルボキシ末端ポリエステルを、双方が溶けかつ凍結乾燥により除去することができる溶剤中に溶解

し、得られる溶液を高速で凍結し、得られる凍結した混合物を凍結乾燥し、得ら

れる混合物をポリエステル成分のための溶剤中に分散し、かつ混合物を、ペプチド-ポリエステル塩が形成されるように溶かすことによる、塩基性ペプチドおよびカルボキシ末端ポリエステルからなる塩の製法を提供する。

特に、この方法で、酢酸中の、ペプチドおよびポリ乳酸または乳酸およびグリコール酸のコポリマーの溶液を、液体窒素に滴加する。この結果、多かれ少なかれ酢酸の瞬間的凍結、および多かれ少なかれ実質的に溶剤不含のペプチド-ポリエステル混合物の発生が生じる。酢酸溶剤を除去するための凍結乾燥は、非常に細かいコロイド寸法でペプチド-ポリエステル生成物を生じる。多くのペプチドに関して、このような材料のコロイドの性質は、ポリエステルのための溶剤、例えばジクロロメタンを加える場合に、非常に微細なコロイド状懸濁液が発生する場合に、かつ過剰のカルボン酸官能価が混合物中に存在する場合に証明され、澄明溶液は、ペプチド-ポリエステル塩が形成される際に過剰の表面エネルギーが失われる場合に結果として得られる。ペプチド/ポリエステル/酢酸混合物を多かれ少なかれ即座に凍結するための他の方法、液体窒素への滴加の代わりに例えばドライアイスおよびヘキサンの混合物中へ混合物の滴加を使用することができる。

仮定的に、もちろん、完全に不溶性の化合物を、もしこれを十分に小さい平均粒径まで減少することができる場合、可溶性にすることができる。粒子が密度 σ を有する半径 r の球であり、かつ粒子が表面エネルギー γ を有すると仮定した場合、このような粒子はそれに付随した表面エネルギー $4\pi r^2 \gamma$ を有する。粒子は質量 $\frac{4}{3}\pi r^3 \sigma$ を有し、かつ従って単位質量当たりの表面エネルギーは $\frac{3\pi\gamma}{\sigma r}$ である。ここで、飽和溶液の2つの場合を考える：

(i) 過剰の固体が非常に粗粒であり、かつ従って非常に小さな表面エネルギーを有し、かつ飽和溶液が、濃度 C_s を有する場合。ギブスの自由エネルギーは次のようになる：

$$G^1_{\text{溶液}} = G_0 + RT \ln C_s = G^1_{\text{固体}}$$

(ii) 過剰の固体が半径 r の非常に小さい粒子である場合、非常に小さな粒子と平衡している溶液のギブスの自由エネルギーは次のようになる：

$$G^2_{\text{溶液}} = G_0 + RT \ln C$$

しかしながら、この場合、固体は次のようなギブスの自由エネルギーを有する：

$$G^1_{\text{固体}} + \frac{3\pi\gamma}{\sigma r}$$

$$\text{および } G^2_{\text{溶液}} = G_0 + RT \ln C = G^1_{\text{固体}} + \frac{3\pi\gamma}{\sigma r}$$

$$\text{または } G^1_{\text{固体}} = G_0 + RT \ln C - \frac{3\pi\gamma}{\sigma r}$$

しかしながら、前記(i)から

$$G^1_{\text{固体}} = G_0 + RT \ln C_s$$

$$\text{かつ従って } G_0 + RT \ln C - \frac{3\pi\gamma}{\sigma r} = G_0 + RT \ln C_s$$

$$\text{または } C = C_s \cdot e^{3\pi\gamma/\sigma r}$$

従って、 r が減少すると、 C (仮定的) は増大する。

通常の場合において、小さな粒径による通常より高い溶解度は準安定性であり、かつ粒子は例えば溶解および再結晶によって寸法が成長するので、高い表面エネルギーの効果が取り消される。しかしながら、小さな粒径のペプチド-ポリエステル混合物を用いて塩形成が生じ、かつこれは、溶液として低い自由エネルギー状態を提供する可溶性両親媒性塩の形成を許容することにより、コロイド状粒子の表面エネルギーの減少の二者選択的な方法を提供する。

本発明のもう一つの態様により、強酸との塩、例えばクロリドまたはスルフェ

ートの形の塩基性ペプチドをポリエステルと反応させることからなり、その際、ポリエステルのいくつかまたは全てが、適當なアルカリ金属またはアルカリ土類金属とのカルボン酸塩、例えばカルボン酸ナトリウム、ーカリウム、ーカルシウムまたはーマグネシウム塩の形である、塩基性ペプチドおよびカルボキシー末端ポリエステルからなる塩の製法を提供する。低い分子量のポリエステル（約1000より少ない平均分子量を有する）のために、アルカリとの塩を水中に溶解するか、または非常に微細に分散することができる。このような溶液または分散液のペプチドの水溶液（有利には二酸化炭素不含）への添加は、結果として、非水溶性の両親媒性ペプチドーポリエステル塩の沈殿を生じる。

同様の方法で、「ペギレート化された(pegylated)」

塩基性ペプチド（ペプチドのポリオキシエチレン抱合体）のクロリドまたはスルフェートは、溶剤、例えばジクロロメタンと一部相容性であるかまたはその中に可溶性であるか、またはそうであってよく、かつカルボキシー末端ポリエステルのナトリウムまたはカリウム塩も、ジクロロメタン中に可溶性であってよい。従って、2種のこのような塩を適當な割合で混合する場合、溶解性ペプチドーポリエステル塩は、アルカリ金属クロリドまたはスルフェートの沈殿を用いる二重分解により生じる。

前記した異なる高分子の熱力学的非相容性は永年知られているが、これは、ポリエステルマトリックスからのペプチド薬の遅延放出の従来技術においてまれにしか考慮されなかった。この熱力学的非相容性または不溶性の必要な考慮は、通常の環境において、ポリエステルがペプチド薬に完全に不透過性であることである。ポリエステルを介する、ペプチド薬の分配一依存フィキアン(Fickian)拡散を生じるために、ペプチドはポリエステル中でのいくらかの溶解性を有しているべきである。しかしながら、前記の理由で、事実はそうでなく、かつ従って、分配一依存フィキアン拡散によるポリエステルを介するペプチドの移動は不可能である。

更に、論拠のために、ペプチド薬またはその合成類縁物のいずれか一つが、ポリエステル中へのいくらか

の可溶性またはそれとの相容性を有する場合ですら、ポリエステル相を介する拡散による移動はやはり不可能である。回転および並進的(translational)ポリエスチルセグメント易動性(mobility)から生じ、かつ拡散分子の通過を許すポリエスチル中の自由体積は、約 500 Da 程度より高い分子量を有する高分子の拡散を調節するためには不十分な大きさであることが長い間認められてきた（例えば、R W Baker および H K Lonsdale, “Controlled Release of Biologically Active Agents” 中の “Controlled Release:Mechanisms and Rates” 参照、編集 A C Tanquary および R E Lacey, Plenum Press, 1974, 15以下参照）。

しかしながら、フィキアン拡散によるポリエスチルを介するペプチド薬の移動が約 500 Da 程度より上のペプチドのために実質的に不可能である場合でさえ、それにもかかわらずポリペプチドの連続放出が達成された。欧州特許第 584 81 号明細書は、ポリエスチルからのペプチド薬の連続放出が、2 種の高分子、親水性および水溶性であるペプチドおよび疎水性および非水溶性であるポリエスチルの非常に異なる特性を用いることにより、どのようにして得られたか記載している。その明細書中に記載された処方物において、ペプチド薬放出は、主に、処方物の表面におけるドメイン(domain)からのまたは処方物の表面と連続または隣接しているペプチド薬のドメインからのペプチドの

1 回の濾過により先ず発生する水性孔を介して達成された。この濾過は、放出の開始段階の準備をし、かつポリエスチルの引き続くバルク加水分解的崩壊は、結果として、ポリエスチル内に更に多孔性を発生させ、かつ従って更に、崩壊および腐食により制御されたペプチド放出が生じうる。加水分解的ポリエスチル崩壊から生じる多孔性が十分に迅速に起きない場合、濾過相からの開始放出は、崩壊—誘導された十分な多孔性が輸送系(delivery system)中で生じる前に完全であり、かつペプチドの不連続的放出が得られる。従って、欧州特許 (E P) 第 584 81 号明細書中に記載された処方物のパラメーターは、放出の 2 つの段階が重なり、その結果、ペプチド薬の連続放出が生じるよう保証するために、ポリエスチルの加水分解的崩壊が開始濾過放出段階に関して適時に起きたように選択される。

しかしながら、ポリエステル相を介するペプチドのフィキアン拡散移動がこのような単純ペプチドーポリエステル混合物の場合に不可能であるのに対して、完全に異なる状況が、場合により遊離ポリマーの存在下での本発明のペプチドーポリエステル塩の処方物の場合に生じる。これらの材料を含有する処方物において、ポリエステル単独からなる分離相は存在しない；それどころか、ペプチドの放出を制御する連続相は、完全にまたは一部、ペプチドーポリエステル塩である。

遊

離ペプチドは、ペプチドーポリエステル塩のこの相中にいくらかの溶解性を有し、かつこのような材料を用いる処方において、他の必要性、例えば効果的ま自由体積が存在する場合に、真のフィキアン、ペプチドの分配－依存拡散が可能である。

ペプチドーポリエステル塩が高い加水分解セグメントを有するので、ペプチドーポリエステル塩処方物はポリエステル単独よりも高い水収容率(water uptake)を有する。更に、これらの処方物中で、ペプチドーポリエステル相互作用のイオン性質により水収容率は更に高められる。これは、ペプチドーポリエステル塩の実質的にヒドロゲルの性質を含み、かつポリカチオニーポリアニオン錯体における高分子セグメントの易動性の程度の増大をもたらす。すなわち、マトリックス材料の効果的な自由体積が増大し、かつ従って高分子ペプチドを調節することができる。

ペプチドーポリエステル塩（場合により遊離ポリマーの存在下で）のこれらの特性の正味の効果は、ペプチドーポリエステル塩のマトリックスまたは混合塩および遊離ポリマー相を介する高分子ペプチドのフィキアン拡散移動を許可することである。これは、ポリエステル単独またはペプチドおよびポリエステルの単純混合物を用いて生じるものと全く異なる状況であり、かつ従って、ペプチドーポリエステル塩の使用から生じる増大された透過性を基礎とする遅延放出マトリックスまたは膜が、本明細書中で前記したペプチドの制御された放出のための処方物の中心である。

従って、本発明のペプチドーポリエステル塩は、腸管外薬輸送系の設計において、水性および非一水性の薬理学的に相容性の注射賦形剤中の遊離ペプチド薬、遊離ポリエステルおよびペプチドーポリエステル塩の種々の混合物を用いる溶液または分散液を基礎として、かつ筋内または皮下的に注射されるか内移植される皮下移植植物を基礎として、親油性溶剤中のこれらのペプチド含有基の新規のおよび意想外の溶解性により、新たなかつ意想外の利点を提供する。更に、これらのペプチドーポリエステル塩を基礎とする処方物は、特に、高い親油性ポリエステルを用いるものは、他の方法によても適用することができる。特に重要なのは、ペプチドーポリエステル塩および／または遊離ペプチド薬および／または遊離ポリエステルの種々の組合せを良好な作用のために使用することができる経口法である。多くの場合、経口投与のために、薬理学的に相容性の担持剤、例えば植物油またはそのおよび単独または他の油との混合物でのモノー、ジーおよびトリーグリセリドを包含する変法を使用することは有利である。あまり重要なものは、部位的、直腸内および鼻腔内の適用法である。

前記した欧州特許第58481号明細書（1982）の他に、ラウター等（前記）およびオカダ等（前記）

は、得られるペプチドーポリマー塩の可能性を記載する明細書で公知の技術の唯一の状態であるが、これらの文献の双方は思索的であり、その中で、この推定的な相互作用がどのように実現されまたは利用されうるか記載していない。本発明のもう一つの課題は、制御された薬物放出の少なくとも3つの異なる特性を与えるために、種々の割合でのペプチドーポリエステル塩および／または遊離ペプチド薬および／または遊離ポリエステルの種々の組合せよりなる遅延放出医薬処方物を提供することである。

本発明のもう一つの態様によれば、前記したペプチドーポリエステル塩および／または遊離ペプチド薬および／または遊離ポリエステルおよび場合により他の薬理学的賦形剤からなる遅延放出医薬組成物を提供することである。

本発明の医薬組成物の設計は、次の考えに基づいている。単純ペプチド薬が通常、水中に溶けるのに対して、ポリエステルおよびその遊離ポリエステルとのそ

の双方の塩は、通常完全に非水溶性である（ポリエステルおよびコーコーポリエステルの非常に低いオリゴマー形に関して、それらはそれ自体、非水溶性である一方、ペプチドーポリエステル塩の形である場合、それらは水に溶けることが認められているが）。しかしながら、ペプチド薬およびポリエステルの混合物（ここで、ペプチドの全ておよび一部は、水性生理学的液体中でペ

プチドーポリエステル塩として存在している）の恒温保持により、結果として、ポリエステルのある程度の崩壊が生じる。これらの崩壊された生成物が非水溶性である場合、ペプチドーポリエステル塩の崩壊は不溶性であるまで続く。他方、ポリエステルが最初に十分に低い分子量であるか、または水溶性のポリエステル—誘導酸性フラグメントが製造されるのと等しくまたは同様に低い分子量のポリマー成分を含有する場合、これらのフラグメント（アニオンとしての）はポリペプチドカチオンとともに共移動可能（co-transportable）である。本発明の新規のペプチドーポリエステル塩組成物に関して、放出の即時性は、ポリエステル成分の分子量および分子量分布に非常に左右される。

分子量分布は、

$$\frac{M_w}{M_n}$$

と定義され、ここで、

$$M_w \text{ (重量平均分子量)} = \frac{\sum w_i \cdot M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum n_i \cdot M_i^2}{\sum n_i \cdot M_i}$$

および

$$M_n \text{ (数平均分子量)} = \frac{\sum n_i \cdot M_i}{\sum n_i}$$

であり、かつ w_i は分子量 M_i を有するポリマー分子の

重量フラクションであり、かつ n_i は分子量 M_i を有するポリマー分子の数である。

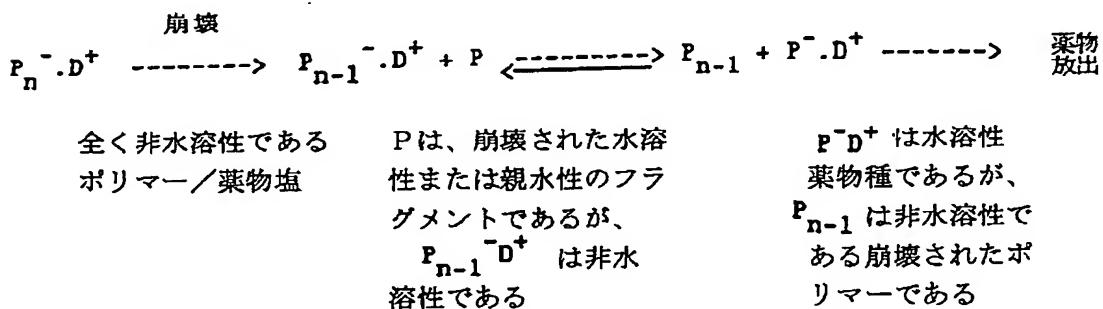
分子量分布は、しばしば、多分散度と称され、かつ狭い、通常のまたは最も可能性のあるおよび広い分布のための種々の値は公知である（例えば、“Polymer Handbook”, 2nd Edition, J Wiley 1975, IV-3参照）。一般的に、1.8より低い多分散度は狭い分布または低い多分散度であり、約 1.8 ~ 2.2 は、通常または最も可能性のある分布または通常の多分散度であり、かつ約 2.2 より上は、広いまたは幅広い分布または高い多分散度であることが認められる。

腸管外法、例えばデポー薬または輸送系の筋内または皮下注射または皮下内移植によるペプチド薬の適用のために、2000 Da より多い数平均分子量および 1% w/v で、25°C で、クロロホルム中で、0.08 dl/g より大きいまたはそれと等しいおよび 4.0 dl/g までおよびそれを含む固有粘度を有するポリエステルは有利である。他の方法、例えば経口による適用のために、有利な数平均分子量の範囲は、500 ~ 5000 Da である。

技術水準で大部分は無視されてきた前記の考察から、水溶性の誘導されたフラグメントの小さなフラクションをちょうど与えるための特に塩基性ペプチドの存在下でのポリエステルの崩壊およびこれが起きるための時間間隔は、分子量および分子量分布により制御され

ることが分かる。水溶性のフラグメントへの実質的に即時の崩壊は、（分子量分布のタイプにより）それぞれ約 10000 Da より少ないおよび約 15000 Da より少ない重量平均分子量を有する狭いおよび通常の双方の分布のポリエステルを用いて生じるが、一般的に、ポリエステルの多分散度が低くなればなる程、水溶性のフラグメントへの即時の崩壊のために必要な重量平均分子量は低くなる。15000 Da より大きい重量平均分子量のポリエステルのためには、通常または広い分布が必要とされる。やはり、これは、ある程度、分子量分布の性質およびタイプに依存するが、一般的に、重量平均分子量が高くなればなるほど、水溶性のフラグメントへの早い崩壊を得るために必要とされる多分散度は高くなる。

ペプチドのいくつかまたは全てが、場合により遊離ポリエステルを含有するペプチドーポリエステル塩の形であるポリエステルまたはコーコーポリエステルおよびペプチド組成物のために、異なる3つの放出特性を得ることができる。これらの第一は、酸性の水溶性のまたは親水性のフラグメントの実質的に即座の崩壊を得るために、ポリエステルの崩壊が起きる場合であり、これは、結果として、ペプチドの即座の放出を次のようなメカニズムによりもたらす：



P = 水溶性の崩壊されたポリエステルフラグメント、または塩基性ペプチドとの塩の形で存在する場合に水溶性になる親水性の非水溶性の崩壊されたポリエステルフラグメント
D = 塩基性ペプチド

第一の場合、組成物は、全ての薬物をペプチドーポリエステル塩として含有するか、または遊離した非結合薬をペプチドーポリエステル塩に付加して含有していくよい（双方の場合において、場合により遊離ポリマーの存在下で）。しかしながら、ポリマーは、ペプチドの存在下で、ほとんど即座に、水溶性のフラグメントへ崩壊し、その結果、ほとんど即座に持続されたペプチドの連続放出が開始される。崩壊組成物を介する水溶性の遊離ペプチドの拡散が、放出を調節する連続相中のペプチドーポリエステルの存在によるマトリックスの増大された透過性により促進されることが注目される。

これらの場合の第二は、ペプチド薬がペプチドーポリエステル塩として存在している（場合により遊離ポリエステルの存在下で）が、ポリエステルが水溶性のフラグメントへと即座に崩壊しない場合である。これは、結果として、ペプチド薬の放出がない開始期間を

生じる。たとえペプチドーポリエステル塩が、マトリックスに、遊離拡散ペプチドへの増大された透過性を与えるとしても、拡散に利用可能な遊離ペプチドは存在しない。全てのペプチドは非水溶性のペプチドーポリエステル塩の形であり、かつポリエステルが水溶性のフラグメントに崩壊し、かつ遊離および移動可能な薬物を生じるのは、かなりの時間の後でしかない。その結果、その間に最初はペプチド放出がない遅延誘導期間が生じ、その誘導期間に引き続いて、放出が開始される。この第二の場合は、可溶性のワクチンおよびペプチドの時間を決められたパルス的な放出のための理論的なものである。

第三の場合は、場合により遊離ポリエステルの存在下で、遊離形およびポリマー薬塩形の双方の形のペプチド薬を含有し、かつそのポリエステルが薬 150 00 Da より大きい（有利には約 30000 Da より大きい）重量平均分子量を有し、かつ狭いまたは最もありうる分子量分布を有する有するするペプチドーポリエステル薬系を基礎とする処方物を、例えば筋内および皮下注射部分で見られるような生理学的環境に置き、不連続的放出を生じる場合である。放出の第一段階は、ペプチド薬の存在およびより透過性のペプチドーポリエステル塩系を介して移動されるその能力により生じる。更に遊離ペプチド薬を得るためにペプチドーポリエステル塩中のポリエステルの崩壊を生じ

る前に遊離ペプチド薬の放出のこの第一段階が完了する場合、不連続なペプチド薬放出は続く。

明らかに、その崩壊の間に、遊離ペプチド薬が組成物に存在しない期間がない場合、連続放出が得られる。この放出特性は、欧州特許第 58481 号明細書に記載されたものと同様であるが、欧州特許第 58481 号明細書における放出のメカニズムおよび使用された材料（ペプチドーポリエステル塩ではない）は、本明細書中で定義したメカニズムおよび材料とは全く異なっている。放出特性に応じて、これらの混合物は、ペプチド、タンパク質および可溶性ワクチンの連続放出のための理論的なものである。

前記したように、これらのペプチドーポリエステル薬塩系、その物理化学的特徴およびペプチドの放出を生じるメカニズムは、欧州特許第 58481 号明細書

および同第52510号明細書中に記載されたものおよびこの発明者に公知である、乳酸およびグリコール酸のホモーおよびコーポリマーからのペプチド放出に関する他の全ての文献とは全く異なっている。これらのうち、欧州特許第58481号明細書、ラウター等（前記）およびオカダ等（前記）のみが、ポリエステルカルボン酸基およびペプチド中のアミノ酸のイオン相互作用から生じる塩形成に関して言及しているが、組成物は、その中に記載されたように、ペプチド薬／ポリエステル塩を含有しなかつた。しかしながら、こ

れらの前記の文献は、この点について思索的であり、かつこのような相互作用が本当に生じることを最終的に確立せず、また彼らはこのようなペプチドーポリエステル塩がどのように製造されかつ単離され、かつ次いで、放出の異なる特性の多様性を用いる、親油性有機溶剤中でのその意想外の溶解性によるペプチドの放出を達成するために使用できるか証明していない。

ペプチドーポリエステル混合物の特性のうち、放出を決定するおよび前記していないものは、ペプチド中の塩基性官能基の数およびポリエステル中のカルボン酸基の数である。前記文献は、ペプチドーポリエステル塩の使用から生じる認められかつ意想外の効果、およびポリエステル単独のまたは二成分が簡単に混合されかつ従ってペプチドーポリエステル塩を含有しない混合物の透過性と比べた場合に、ペプチドーポリエステル塩を完全にまたは一部含有する系の意想外に高い透過性に関しても記載していない。

透過性におけるこの相違は、簡単な拡散細胞実験で証明され、ここで、二つの水性コンパートメントに分かれ、一方がペプチド水溶液を有しつつ他方が水相のみを含有する連続するおよび欠陥のないポリエステル膜は、膜ポリエステルの著しい崩壊の前に、それを通つてのペプチド移動を許容しない。これに対して、完全にまたは一部ペプチドーポリエステル塩を含有する膜は、ペプチドが500Daより大きい分子量を有す

る場合ですら、分配依存拡散により、塩-含有膜を通つての薬物の移動を許容する。

本発明のペプチドーポリエステル塩は、同様の従来技術材料で知られなかった、特に、薬理学的輸送系の設計および製造において有効である、他の意想外でかつ有効な有利な特性を有する。これらの特性の最も有効なもの一つは、ペプチドが通常完全に不溶性である有機溶剤中でポリエステル塩の形である場合のペプチドの良好な可溶性である。このことは、薬輸送系の製造のために使用される新たな工程および方法を許可し、かつ特に無菌的製造を促進する、薬剤の製造における非常に多くの利点を生じる。これらの工程および方法および使用される材料は、従来技術に記載された方法および材料とは全く異なるものである。

従って、場合により可溶化されたまたは分散された形で遊離ポリマーおよび/または遊離ペプチドを含有するペプチドーポリエステル塩の溶液を無菌濾過することができ、従って、固体または懸濁液ペプチド処方物の無菌製造に通常結びついた問題を軽減する。従って、ペプチドーポリエステル塩の無菌濾過された溶液は、無菌環境における種々の薬理学的乾燥法に作用させることができる。固体粒子を生じる噴霧乾燥、噴霧凝固および他の乾燥法は、それ自体、無菌操作に迅速に役立つ有利な方法である。

特に有効であるのは、薬理学的に相容性の注射賦形

剤中に懸濁することができる、 $0.2\text{ }\mu\text{m} \sim 500\text{ }\mu\text{m}$ の大きさの粒径を有する微粒子の発生である。このような微粒子は、使用前に水性注射賦形剤中に、または二者選択的に、使用される材料のための非溶剤である有機注射賦形剤中に懸濁することができる。乳酸およびグリコール酸のホモーおよびコーコーポリマーを基礎とする輸送系のために、適当なこのような有機賦形剤は、非常に親油性の油状物、例えば（これに限定されないが）オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、植物油および種々の脂肪族グリセリドである。ある環境において、このような親油性賦形剤の混合物を使用することは有利である。

このような親油性賦形剤は、乳酸およびグリコール酸を基礎とするデリバリー形のための非溶剤であるが、これらは、非常に親油性のポリエステル、例えば長鎖ヒドロキシ酸を基礎とするようなもの、例えばヒドロキシステアリン酸と共に使用することは不適当である。このような非常に親油性のポリエステルまたはコ

一ポリエステルのためには、親水性有機注射賦形剤、例えば（これに限定されないが）プロピレングリコールおよび低分子量ポリエチレングリコールが有利である。明らかに、水性注射賦形剤は、より親油性のポリマーを基礎とする輸送系にも適當である。

微粒子を製造するための二者選択適方法は、他の意想外でかつ有利な本発明のペプチドーポリエステル塩の特性を利用する。ペプチドーポリエステル塩は、むしろ熱力学的に水性または極性環境または相中に存在するかまたは溶ける親水性ペプチド、および疎水性でありかつむしろ熱力学的に疎水性相中に溶けるポリエステル鎖からなる。すなわち、ペプチドーポリエステル塩は両親媒性であり、かつ単純ペプチド塩中には存在しない界面活性の特徴を有する。この界面活性は、むしろ相界面に存在するペプチドーポリエステル塩を生じ、かつ塩の一般的性質（疎水性鎖の割合および長さ）により、大部分の水相中でもっとも熱力学的に安定なタイプの分散液は、ペプチドーポリエステル塩が、水中の分散液として存在することである（臨界ミセル濃度が非常に低いので、全ての塩が多くの状況で界面に存在しうるとは限らない）。

従って、ペプチドーポリエステル塩が、水性分散液の安定性を作り、並びに保持するために、非常に効果的な分散剤であることが分かる。微粒子薬理学的処方物を製造するためのこの第二の方法において、ペプチドーポリエステル溶液（例えばジクロロメタン中の）は、場合により粘度-強化ポリマー、例えば（これに限定されないが）ポリビニルアルコールを有していてもよい水相中に、ペプチドーポリエステル塩の界面活性特性を用いて簡単に分離される。このようなペプチ

ドーポリエステル塩を含有するいくつかの有機溶液は自然に分散しうるが、一般的な方法として、攪拌または剪断が水性分散液の製造において必要とされる。

前記したような方法の更に有利な態様は、水性分散が二酸化炭素の不存在下でおよび不活性雰囲気中で有効に実施されるように、操作を実施することである。ペプチドーポリエステル塩の有機溶液が二酸化炭素不含であることは、更に有利である。それというのも、通常状態下での大気および水中の二酸化炭素の濃度は

、ポリエステルカルボン酸基の濃度と比較して、次の等式にしたがって、質量作用効果により競争塩処方物中に入るために、十分に高いからである：



(ここで、Pはポリエステルであり、かつDはペプチド薬である)。次いで、得られる水性分散液を、種々の技術、例えば有機溶剤の真空中での除去、引き続き凍結乾燥、または1回凍結乾燥操作での溶剤および水の双方の直接除去により乾燥させる。次いで、得られた生成物を、前記の方法で、適当な注射用医薬調合物を製造するために使用する。

微粒子の医薬組成物を製造する更に二者選択的方法は、適当な有機溶剤または賦形剤中の、コロイド状に分散する遊離ペプチドを含有するペプチドーポリエステル塩の実質的に乾燥した溶液を使用する。(「実質

的に乾燥した」という用語は、ペプチドからの水のすべての痕跡を除去することが目で見ては不可能であり、かつ更に、薬物は全く、分離水相中に水性溶液として存在しないことを意味する。) 激しい攪拌の状態下でポリマーのための非溶剤を添加し、引き続き、沈殿した微粒子を更に硬くし、かつ安定化するために、多量の第二の非溶剤へ、溶剤一膨張したペプチドーポリエステル塩(場合により遊離ポリマーを含有し、かつ場合により遊離薬物を含有する)を添加することにより、最終形が生じる。明らかに、適当な条件下で、または適当な界面活性剤、例えば(これに限定されないが)ソルビトールの脂肪酸エステルの存在下で、微粒子の沈殿がポリエステルのための単独の非溶剤、例えばパラフィン、例えはヘキサンを用いて実施される。

前記した種々の方法により製造される微粒子は、ペプチドがポリエステル単独の相中にカプセル化される欧州特許52510号明細書(Syntex)および同第145240号明細書(タケダ)で略述された方法により製造されたマイクロカプセルとは構造的に完全に異なっている。マイクロカプセルは、連続する第二の相内の一つの化合物または材料の一つ以上のコアとして定義され、従って、第二相材料の連続被覆は、マイクロカプセルの表面に材料が存在するこがないように、

コア材料を完全に取り囲むかまたはマイクロカプセル化し、かつマイクロカプセル化されたコア材料は、カプ

セル化されていないコア化合物または材料の物理化学的および熱力学的特性を全ての点に関して保持する。

従って、欧洲特許第52510号明細書において、相分離コアセルベーション法は、ペプチドの希釈水溶液の液滴を被覆するために使用され、従って、ポリマー単独が水溶性液滴の周りを連続的に被覆することになる。すなわち、微小球の幾何学および形状を有する真のマイクロカプセルである。沈殿したマイクロカプセルの単離および硬化および乾燥の後に、ペプチド薬がポリマー外皮内の離散コアとして存在する生成物が得られた。乾燥前のマイクロカプセルの内部の水の存在故に、ポリマーのガラス転移温度より低い温度での脱水工程の間のその除去は、結果として、非常に小孔性(doraminous)である粒子を生じる。欧洲特許第52510号明細書中で使用されたまたは記載された方法および材料はペプチドーポリエステル塩を含んでおらず、また前記の工程は、無菌製造が必要とされる場合に、ペプチドーポリエステル溶液または懸濁液の無菌濾過を許さない。

更に、この前記特許文献は、特に、米国特許第3773919号明細書(Boswell)中に記載された、この中で、25°Cでベンゼン可溶性であると定義される乳酸およびグリコール酸を基礎とするポリエステルを使用した。本発明において、乳酸および/またはグリコール酸を基礎とするベンゼン不溶性ポリエステル

(しかし、これはクロロホルム中に可溶性である)は、比較的短いデリバリー期間、すなわち2ヶ月より少ない期間のために有利である。

欧洲特許第190833(タケダ)号明細書中で、ペプチドは、ゲル化された薬物の水溶液として取込まれ、かつゲル化された水相は、ポリマー溶液中に分散された。次いで、この油(ポリマー溶液)中水(水性薬物ゲル)型分散液を、それ自体、剪断下に水中に分散させて、水中油中水型(water-in-oil-in-water)二重分散液を得た。真空下での有機溶剤の除去後に、薬物/ゲル化剤がポリマー単独によりカプセル化された親油性のマイクロカプセルが得られた。この方法の生

成物は、薬物を単純な塩として保持し、ペプチドのポリマー塩として保持するのではない。従って、本発明の医薬処方物は、マイクロカプセルが、薬物のコアが完全にポリマー単独により密閉されている微少球(microspheres)の形状および幾何学を有する欧州特許第52510号、同第145240号および同第190833号明細書中に記載された生成物とは全く異なる構造、物理化学的特性および熱力学的特性を有する。

本発明の生成物は、(これに限定されないが)微少球の幾何学および形状を有していてよいが、これらは前記したようなマイクロカプセルでは全くなく、むしろペプチドーポリエステル塩(場合により遊離ポリマーも含有している)の溶液であるか、またはこれらは、

遊離ペプチド薬が場合により遊離ポリマーも含有しているポリマー薬物塩の連続相内または被覆内にカプセル化されるマイクロカプセルである。前記したように、このようなポリマー薬物塩の透過特性は、遊離ポリマー単独のものとは全く異なるので、本発明の生成物は、前記欧州特許第52510号、同第145240号および同第190833号明細書中に記載されたものとは全く異なる方法でそのペプチド薬負荷を放出する。

従って、本発明のもう一つの態様は、場合により遊離ポリマーを含有するペプチドーポリエステル塩の溶液を用いる、マイクロカプセルではない微少球の製造、またはマイクロカプセルであるが、場合により遊離ポリマーを含有するペプチドーポリエステル塩の相または被覆によりカプセル化された遊離薬物からなる微少球を製造することである。

このような種々異なる粒子は、種々の異なる方法、例えば沈殿、相分離コアセルベーション、噴霧乾燥および噴霧凝固により製造することができる。有利な粒径は $0.2\text{ }\mu\text{m} \sim 500\text{ pm}$ にわたり、かつ前記粒子は適当な注射賦形剤中の懸濁液として注射することができる。

特に効果的でかつ有効なペプチド薬の腸管外医薬処方物は、遊離ポリエステルのための溶剤であるがペプチドおよびその単純塩のための非溶剤である薬理学的

に相容性の有機溶剤、例えばクロリドおよびアセテート中の、場合により遊離ポリエステルを含有し、かつ場合により分散されたまたは溶解された遊離ポリエステルを含有する薬物-ポリエステル塩の溶液の形で製造することもできる。

従って、しかしながら、本発明により、次の組成からなる組成物が溶液の形であることを特徴とする、ペプチド薬の遅延放出のための、ペプチド薬およびポリエステルからなる医薬組成物を提供する：

(a) ポリエステルとの塩の形である少なくとも300Da、特に少なくとも800Daの分子量を有する前記のような塩基性ペプチド薬（その際、塩は、塩基性ペプチドのカチオンおよびカルボキシ末端ポリエステルのアニオンからなる）

、

(b) 遊離ポリエステルのための溶剤であるが、遊離ポリペプチドのための溶剤ではない薬理学的に相容性の有機溶剤、

(c) 過剰のポリエステル、および場合により

(d) 可溶化されたまたはコロイド状に分散された形の過剰の遊離ペプチド薬。

適当な塩基性ペプチドおよびカルボキシ末端ポリエステルは、前記のものであり、かつ特に有利なペプチドは、前記の合成LHRH類縁物である。

ポリエステルが乳酸およびグリコール酸のホモーおよびコーポリマーを基礎とするポリエステル-ペプチ

ド薬塩のために適当な、薬理学的に相容性の有機溶剤は、これに限定されないが、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール、乳酸エチル、グリセリルトリアセテート、クエン酸のエステルおよび低分子量(<1000)ポリエチレングリコール、アルコキシポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールアセテート等を包含し、かつこれらのうち、安息香酸ベンジルおよびベンジルアルコールは有利であり、特に安息香酸ベンジルは有利である。

このような有機溶剤のための唯一の要求は、薬理学的に相容性であり、かつポリエステル-ペプチド薬塩がその中に可溶性であることである。このような溶剤の単独を使用しようと、またはこのような溶剤の混合物を使用しようと、このような溶剤の可溶性は、簡単な実験によって容易に測定することができる。乳酸お

およびグリコール酸のホモーおよびコーポリマーは、もっとも極性および疎油性のポリエステルであり、かつオレイン酸エチル、植物油および他の親油性担体のような有機注射溶剤中に溶けないが、親油性モノマーまたはコーモノマーまたは親油性ヒドロキシ酸、例えばヒドロキシステアリン酸を基礎とするホモーおよびコーポリマーは、このような親油性注射賦形剤中に可溶性である。

本発明の溶液組成物を形成するために溶かされる固体中のペプチド薬対ポリエステルの比は、もちろん、

ペプチド薬の能力、使用したポリエステルの性質および所望されるペプチド薬放出の期間により変化する。

ペプチド薬組込みの有利な程度は、0.1～30%w/vである。一般的に、最適な薬物負荷は、ポリエステルの分子量およびその分子量分布、所望された放出の期間およびペプチド薬の能力に左右される。明らかに、比較的低い能力の薬物のためには、高い程度の組込みが要求される。

組成物による水収容は、ポリエステルの加水分解分断率を制御する重要な因子であり、かつ水収容の割合は、組成物上での薬物負荷により決定される程度までである。従って、比較的短い期間にわたって、すなわち3ヶ月、比較的迅速な薬物放出が望まれる場合に、30%までのペプチド薬負荷が適当である。

コーポリエステルのモノマー組成物、例えばラクチドーコーグリコリドポリエステル中のラクチド対グリコリドの比も、ポリエステル崩壊およびペプチド薬放出の速度を決定する際に重要である。放出の持続時間も、一部、ポリエステルの重量平均分離量により決定されるが、薬物-ポリエステル塩として組込まれうるペプチド薬の量は、数平均分子量により決定される。すなわち、多分散度（重量平均対数平均分子量の比）は重要なパラメータである。

従って、例えば、1～4ヶ月のペプチド薬放出の持続時間に、多分散度1.2～2.2を有する4000～

20000の重量平均分子量のポリエステルおよびペプチド薬含有率0.1～30%からなる組成物は有利である。一般的に、薬物負荷が低くなればなるほど数

平均分子量は低くなり、かつポリエステルの多分散度が高くなればなるほど望ましい。長い放出期間、すなわち2~6カ月のために、0.1~20%のペプチド薬物負荷、および重量平均分子量8000~20000および1.5~>2.2の多分散度を有するポリエステルを使用することは有利である。6カ月よりも長い放出期間のためには、0.1~10%のペプチド薬物負荷が有利であり、その際、求めるポリエステルは、重量平均分子量20000~50000および多分散度>1.8を有する。

本発明の組成物中の全ペプチド-ポリエステル固体の組込みの程度は、もちろん、ペプチド成分の能力、ペプチド薬の輸送が望まれる期間、選択した溶剤中の全固体の可溶性および適用に望まれる溶液組成物の容量および粘度に応じて変化する。

本発明の溶液組成物の粘度は、ポリエステルの分子量およびペプチド薬負荷により決定される。一般的に、固体約40w/v%（ペプチド薬物/ポリエステル塩、遊離薬物、遊離ポリエステル）より多く含有し、かつこの中でポリエステルが>8000の重量平均分子量を有する溶液は、その粘度故に注射による適用が困難である。したがって、≤40w/v%の溶液が、これ

らのポリエステルのために有利である。約8000~約20000の重量平均分子量のポリエステルからなる溶液組成物のためには、≤30w/v%の濃度が有利であり、約20000~約50000の分子量のポリエステルからなる溶液組成物のためには、≤20w/v%の濃度が有利である。いくつかの環境において、例えば、組成物を非常に細い針を用いて注射することが望まれる場合に、非常に低い粘度の溶液が有利であり、かつ濃度は、2w/v%またはそれ以下まで減少されうるが、粘度の減少と、注射するために必要とされる容量の増大との間には平衡が存在する。

本発明によるもう1つの特徴によれば、

1. 塩基性ペプチド薬およびポリエステルの均質混合物を製薬学的に認容性の溶剤中に溶解し；または

2. C₁～C₆アルカノール中のペプチド薬の溶液を、注射に適した溶剤中のポリエステルの溶液に緩徐に添加し、その後、ヒドロキシル溶剤が注射のために製薬学的に認容性でない場合には、蒸発によって除去するかまたはヒドロキシル溶剤が注射のために製薬学的に認容性である場合には、該ヒドロキシル溶剤の除去は不用にできる

ことからなる本発明の組成物の製造法が得られる。

上記方法1で使用された塩基性ペプチド薬およびポリエステルの均質混合物は、有利に、塩基性ペプチドおよびポリエステルを、塩基性ペプチド薬およびポリエステルの双方を溶解する能力があり、かつ凍結乾燥される能力がある溶剤または溶剤混合物中に溶解することによって得られる。この種の溶剤または溶剤混合物の適當な例は、氷酢酸およびジオキサンと水との混合物であり、次に、こうして得られた溶液は凍結乾燥させられる。また、この2つの成分は、例えばジメチルスルホキシド中に溶解され、引き続き、該溶剤は除去されてもよい。

また、該均質混合物は、ペプチド薬をヒドロキシル溶剤中、例えばメタノール中に溶解し、該溶液を、例えばジクロロメタン中のポリエステルの溶液に添加し、

次に、該溶剤を、例えば蒸発によって除去することによって得ることもできる。

また、塩化物の塩のようなペプチド薬の水溶液を、ポリエステルのナトリウム塩の水溶液または分散液に添加し、該混合物を凍結乾燥させて、ペプチド薬／ポリエステル塩および塩化ナトリウムの混合物を生じさせてもよい。この塩化ナトリウムは、望ましい場合には、有機溶剤中の製品を混合し、不溶性の塩化ナトリウムを濾別することによって除去してもよい。

方法1の場合、製薬学的に認容性の溶剤中への均質混合物の溶解を、反応混合物の加熱および／または攪拌によって促進してもよい。

上記方法2の場合、ペプチドにとって適當なアルカノール溶剤は、例えばメタノール、エタノールまたはプロピレン-1, 2-ジオールである。

場合によっては遊離薬および／または遊離ポリエステルを含有するポリエスチル-ペプチド薬の塩の溶液の形での製薬学的ペプチド薬製品の主な利点は、患者

へ投与する前の前混合のために何ら必要とせずに直ちに使用するための滅菌された形での注射可能な製品の調製物が、滅菌濾過を用いて製造することができるこ^トである。このことは、固体または懸濁液製品の滅菌よりも、はるかに単純な製造作業である。滅菌された注射可能な溶液の製造のための選択的な過程は、場合によっては遊離薬および／または遊離ポリエステルを

含有する滅菌されたポリエスチルーペプチド薬塩を、製薬学的に認容性の有機注射ビヒクル中に溶解することである。

前記調製物は、投与の腸管外経路のための一次調製物であるとしても、本発明のポリエステル薬塩は、経口投与可能な処方物の製造に使用してもよい。

注射ができるかまたは皮下に植え込まれるとができる処方物のまったく異なる型は、移植植物または移植植物の異なる型の混合物を基礎とする薬輸送系である。これは、場合によっては遊離薬および／または遊離ポリエステルを含有する本発明のポリエスチルペプチド薬塩から、常用の溶融ポリマー二次加工技術、限定するものではないが、例えば押し出し、圧縮、射出成形を用いて製造することができ、この場合、高められた温度（有利に100℃未満）は、移植植物の製造の場合にポエステル薬塩を溶解させるために使用される。この種の移植植物の製造は、無菌条件下にまたは選択的に照射による末端滅菌によって実施することができ、この場合、限定するものではないが γ 線またはX線を使用する。この固体用量形は、粉碎または微粉碎によって微粒子形に変えることができる。好ましい粒度は、 $1\text{ }\mu\text{m}\sim 500\text{ }\mu\text{m}$ の範囲内であり、この微粒子輸送系（マイクロスフェアでもマイクロカプセルでもない）は、適当な常用の製薬学的に認容性の注射ビヒクル中に懸濁させることができる。

ペプチドーポリエステル薬塩の溶融法は、本発明のペプチドーポリエステル薬塩の物理化学的性質および熱動力学的性質と、遊離ペプチドおよびその単純な塩の物理化学的性質および熱動力学的性質との間の最も意義がありかつ重要な違いを包含しつつ説明する。多くの場合、本発明のペプチドーポリエステル塩は、溶解しないが、しかし、高められた温度で分解する遊離ペプチドおよびその単純な

塩、例えば塩化物および酢酸塩とは異なり、溶融しつつ流動する。

ポリエステルの崩壊は、部分的には、該ポリエステルの分子量および多分散度に左右される。明らかに、エステル基の加水分解による切断によって主として生じる崩壊のために、ポリエステルまたはポリエステルを含有する医薬品は水を吸収しなければならない。放出量を制御するマトリクスまたは膜が完全にかまたは分的にペプチドーポリエステル薬塩を含有するような系のために、ポリエステルだけのものと比べた場合、制御するマトリクスまたは膜によって、より高度に水が吸収されることになる。従って、ポリエステル薬塩を含有する連続マトリクス相または膜は、ポリエステルだけを基礎とする連続的マトリクス相または膜とは異なって崩壊する。また、放出量を制御するようなポリエステルマトリクスまたは膜中への水または生理学的液体の拡散率は、部分的には崩壊率を制御することになる。また、水または生理学的液体のこの拡散は、
~

処方物の寸法および形状によって決定され、同様にまた、ポリペプチドおよびポリエステルのポリマー塩を含有する組成物からの薬放出量は、前記の要因に左右される。

本発明のペプチドーポリエステル薬塩のポリエステル成分として特に重要なものは、乳酸およびグリコール酸のホモポリマーおよびコポリマーを基礎とするものであり、この場合、乳酸は、その光学活性形およびラセミ形の任意の1つまたはそれ以上の形であってもよい。この一般的な型のポリエステルは、久しく知られており、かつ種々の放出量を制御された薬輸送系の詳細について研究されている（例えば、“Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems” M Chasin & R Langer、Marcel Dekker編中のD H Lewisによる“(Controlled Release of Biocactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers” を参照のこと、前記文献は、本明細書中に参考のために引用したにすぎない）。

例えば、米国特許第3773919号明細書には、広く一般的な意味で、抗菌性のポリペプチドを含有するラクチドポリエステルおよびラクチドコポリエステルからなる放出量を制御された医薬品が製造されうることが示されている。しかしながら、前記米国特許明細書に開示された抗菌性のペプチドは、該ペプチドが

硫酸塩として生じるかあるいはまたポリエステルーペ

プチド薬塩の形成を阻止するかまたは妨害する他の特徴を有するので、ポリエステル塩を生成するためには不十分である。確かに、本明細書中に示された例は、次に、開示されたように高められた温度で、ペプチド薬と、その性質にかかわりなく、1個のポリマーとの混合を続ける場合、ペプチド薬の突発的分解を生じる。

同様に、抗菌性のポリペプチド、コリスチンは、欧州特許第25698号明細書中には、多くの列挙された化合物の1つとして開示され、該化合物は、ポリラクチドを用いて処方できるといわれているが、しかしやはり、この化合物は、ポリエステルの末端カルボン酸基との塩の形成を妨害する構造的特徴を有している。コリスチンは、製薬学的には、硫酸コリスチンまたはコリスチヌルホメタン酸ナトリウムとしてだけ使用され、双方の形成のいずれも、本発明によるポリエステルとの両親媒性の塩の製造できるようにするものではない。乳酸およびグリコール酸のホモポリマーおよびコポリマーを基礎とする生物分解可能なポリマーを有するポリペプチドの使用を開示する他の従来技術は、欧州特許第52510号明細書、同第58481号明細書、同第145240号明細書および同第190833号明細書であり、上記されている。

乳酸およびグリコール酸のコポリマーが久しく知られているとしても、薬放出マトリクスとして使用され

た場合に、コモノマー単位の分布、その後の配列の長さ（ランダムではなくコポリマー中の同じ個々のコモノマーの配列の長さ（runs））およびこの種の構造変化の作用についてのその構造の複雑さは、従来技術において無視されていた。このコポリマー構造は、部分的に、崩壊速度と同様に、ベンゼンのような溶剤中のポリマーの溶解度または膨潤度の双方を測定する。この相関関係は、まず、ハッチンソン(Hutchinson)によって注目されたが（欧州特許第58481号明細書）、しかし、本発明中で拡大されかつ詳細にされている。

この点を説明するために、米国特許第3773919号明細書には、ベンゼン

中に溶解するラクチドおよびグリコシドの50/50のコポリエステルを用いる放出量を一定に制御された薬処方物が開示されているが、実際には、この米国特許明細書は、（乳酸／グリコール酸コポリマーについて）ベンゼン可溶性であるものに特に限定されている。更に、前記ベンゼン可溶性コポリエステルの有用性は、欧洲特許第52510号明細書中でのその詳細な使用によって強調されていた。しかしながら、早期の米国特許第2703316号明細書（米国特許第3773919号明細書と共に特許権者であった）には、ベンゼン中に不溶性である50/50のラクチド／グリコシドコポリエステルが開示された。前記の2つの米国特許明細書は、共通

の特許権者(duPont)だったので、前記特許明細書の後者で特許の保護を請求された発明の場合、ベンゼン不溶性コポリマーは、ベンゼン可溶性であったものと比較していくつかの点で劣っていたと推測されなければならない。この点は、米国特許第3773919号明細書のベンゼン可溶性コポリマーだけを使用した欧洲特許第52510号明細書によって強調されている。

従来技術は、本出願人等による欧洲特許第58481号明細書以外には、乳酸およびグリコール酸のコポリエステルの構造がその溶解度および崩壊度に対して有している作用を無視していた。本出願人等は、同じ分子量および分子量分布のポリエステルについて、次の一般的関係は、最も多くの場合、クロロホルム中に25℃で可溶性であるポリエステルに当てはまり、即ち、ベンゼン不溶性のポリエステルは、ベンゼンによって膨潤するが、しかし、溶解しないポリエステルよりも迅速に崩壊し、同様にベンゼンで膨潤可能なポリエステルは、崩壊実験が、水性の生理学的液体中かまたは緩衝液中でpH7.4で37℃で行われる場合には、ベンゼン中で自由可溶性であるポリエステルよりも迅速に崩壊する。その結果、相対的に短い期間に亘って、例えば一週間ないし2か月の腸管外処方物からのペプチドの連続的放出量を得るために、ベンゼン中に不溶性であるポリエステルを使用することは特に有

用である。

従って、ペプチド0.1w/v%ないしペプチド75w/v%までを含有してもよい組成物について、次のものは、ポリエステル組成物および該組成物の構造、粘度および多分散度に関連しているものとみなされる。

一週間から2か月の期間に亘って連続的に薬を放出させるための本発明により処方することができるペプチドーポリエステル薬塩の製造のためには、有利に、標準ないし広い多分散度を有するこの種のベンゼン不溶性ポリエステルのモル組成物は、有利にグリコール酸（またはグリコシド）60%／乳酸（またはラクチド）40%ないしグリコール酸（グリコシド）約25%／乳酸（またはラクチド）75%までの範囲であり、かつこの種のポリエステルは、有利に、0.08～4.0dl/gの範囲内の25℃でクロロホルム中で1w/v%での固有粘度を有する。

分子量および分子量分布を包含するポリエステルパラメーターの適当な選択によって、また、本発明による処方物からの一週間ないし2か月の期間に亘るポリペプチドの連続的放出を達成することも可能であり、この場合、ベンゼン中で可溶性であり、クロロホルム中1%で25℃で0.08～0.5dl/gの固有粘度を有し、かつ狭いないし広い多分散度を有するポリ乳酸ホモポリマーかまたはグリコール酸（またはグリコリド）35%／乳酸（またはラクチド）65%ないしグリコール酸（またはグリコリド）10%／乳酸（またはラクチド）90%の範囲内のモル組成を有するコポリエステルを使用する。

本発明による処方物からの相対的に長い期間、例えば2～6か月に亘るペプチドの連続的放出は、ベンゼン可溶性であり、0.2～4.0dl/gの25℃でクロロホルム中で1w/v%での固有粘度および標準的ないし高い多分散度を有するポリ乳酸ホモポリマーかまたはグリコール酸（またはグリコリド）25%／乳酸（またはラクチド）75%ないしグリコール酸（またはグリコリド）0%／乳酸（またはラクチド）100%の範囲内のモル組成を有するコポリエステルを用いて達成することができる。

本発明による処方物からの極めて長い期間、例えば2年までに亘るペプチドの連続的放出は、ベンゼン可溶性であり、0.2～4.0dl/gの25℃でクロ

クロロルム中で1w/v%の固有粘度を有するポリ乳酸ホモポリマーまたはグリコール酸（またはグリコリド）25%／乳酸（またはラクチド）75%ないしグリコール酸（またはグリコリド）0%／乳酸（またはラクチド）100%の範囲内のモル組成を有するコポリマーを使用して達成することができる。

相対的に短い期間、例えば2か月までの時間を定められたかまたはパルスにされた（放出前の誘導期を有する）放出または非連続的放出（この場合、放出の初期段階に、放出されないかまたは効果的でない放出期間が続き、次に、放出の第二段階が続く）は、本発明による処方物を用いて達成することができ、この場合、狭いないし最もありうる分子量分布および0.3～4.0dl/gの25℃でクロロルム中で1w/v%での固有粘度を有するベンゼン不溶性ポリマーを使用する。

新規であり本発明を、全ての他の以前に記載されたポリエステルまたはコポリエステルを基礎とする放出量を制御された薬輸送系と区別し、更に放出速度を制御する本発明の更に別の特徴は、（場合によっては遊離薬および／または遊離ポリマーの存在下での）ポリエステル塩としてのペプチドの混和の水準である。この更に制御する特徴は、ステロイドのような相対的に低い水溶性を有する高い脂肪親和性薬の輸送に向けられているポリエステルを基礎とする更に従来の輸送系の場合の放出速度を増大させることになるようなパラメーターとは全く異なる。前記の場合、薬の混和の水準が増大するので、この種の系の水の吸収量が減少されるととも、脂肪親和性薬の増大した相容積に基づき、放出の速度は、増大したとみなされる。実際には、ステロイドのような薬のかかる増大した放出速度は、薬の熱力学的識別点を保持する薬および単純なフィックの拡散力学(Fickian diffusion kinetics)(Baker and Lonsdale、上記引用文)に左右される。

これは、ステロイドのような薬については、薬負荷が増大し、かつ脂肪親和性薬を得ることにより、脂肪親和性ポリマー中への多少の可溶性を有するので、単純なフィックの拡散速度は増大するということである。

しかしながら、本発明の製品とは、全体的に異なる条件が存在する。現在、ボ

リエステルおよびコポリエステルの崩壊の主要な構成要素の一部は、エステル基の加水分解および前記加水分解の発生が、水の吸収量に左右されるような程度の速度であることが認められている(Pitt and Zhong-wei gu, J.Controlled Release、第4巻、第283～292頁(1987年)；Hutchinson and Furr、同書、第13巻、第279～294頁(1990年)を見よ)。ペプチドは親水性であり、ポリエステルとの該ペプチドの塩の形成は、ポリエステルだけのものよりも高度の水の吸収量を有するポリエステル薬塩を含有する相を生じる。これは、塩の中のポリエステル鎖が、同様の組成、分子量および多分散度を有する遊離ポリエステルだけものよりも迅速に崩壊することができるということである。ペプチド放出は、崩壊に著しく左右されるので、その場合、放出は、部分的に、組成物中でのポリエステル-ペプチド薬の混和の水準および塩の中でのペプチドの割合の双方によって決定される。同じ組成および構造のポリエステルまたはコポリエステルについては、前記パラメーターの一方または双方を増大させることにより、

放出速度を増大させ、従って、一定の環境下で、放出を生じうる期間を減少させることができる。ポリエステル薬塩としてかまたは遊離ペプチドとの組合せ物中のポリエステル薬塩としてのペプチド薬の混和の水準は、有利にポリエステル薬処方物中で0.1w/w%～75w/w%の範囲内である。

本発明の組成物およびポリエステル分子量および多分散度を有するその変法中のペプチド薬負荷は、以下の通りである。極めて長い期間、例えば2年までに亘るペプチドの連続的放出については、1.0w/w%～20w/w%の範囲内の薬の混和の低い水準は好ましく、この場合、好ましくは20000Daまたはそれ以上の重量平均分子量および2.2を上廻る、有利に3.5を上廻る多分散度を有するポリエステルを使用する。また、極めて長い期間の放出ための前記パラメーターは、部分的に、薬処方物中の他の特徴、例えばコモノマー含量に関する組成、構造、ベンゼン中での溶解性/不溶性、投与形の形状および寸法に左右される。約20000の重量平均分子量のポリエステルは、その構造、組成および多分散度のような要因に応じて約0.2の固有粘度を有する。

相対的に長い期間、例えば6か月までに亘る連続的放出については、ペプチド薬の混和の好ましい水準は、0.5w/w%～35w/w%の範囲内であり、この場合、有利に10000Daまたはそれ以上の重量平均分子量および多分散度を有するポリエステルまたはコポリエステルを使用し、この場合、全ての他のパラメーター、例えば組成、構造、ベンゼン中での溶解性／不溶性、投与形の形状および寸法に左右される。

相対的に短い期間、例えば2か月までに亘る連続的放出については、ペプチド薬の混和の好ましい水準は、0.1w/w%～75w/w%の範囲内であり、この場合、好ましくは2000Daまたはそれ以上の重量平均分子量および1.2を上回る多分散度を有するポリエステルを使用し、この場合、全ての他のパラメーター、例えば組成、構造、ベンゼン中での溶解性／不溶性、投与形の形状および寸法に左右される。

更に、本発明による処方物からのペプチド薬放出を制御し、かつ乳酸およびグリコール酸のホモポリマーおよびコポリマーを基礎とする輸送系の従来技術の型には存在しない付加的なパラメーターは、ペプチド薬分子中に残留するアルギニンおよびリジンのような塩基の数に関してはペプチドの官能性であり、平均的なポリマーまたはコポリマー鎖によって含有されるカルボン酸基の平均数に関してはポリエステルまたはコポリエステルの官能性である。一般に、ペプチド薬の連続的放出については、ペプチド＝ポリエステル高分子電解質錯体中のこの種の多官能性相互作用の水準が大きければ、それだけ一層、必要とされる多分散度は

大きい。これとは異なり、非連続的またはパルス的放出については、2.2未満の多分散度は好ましい。

異なる化学構造を有する2つのポリマー型の相容性または可溶性の相対的に僅かに発生することの1つは、乳酸およびグリコール酸のホモポリマーおよびコポリマーを基礎とするポリエステルと、低分子量のポリオキシエチレンおよび特に低分子量のポリエチレングリコールとの混合物によって説明される。この相容性

は、本発明の場合、新規かつ予想されなかつた方法でポリエステルーペプチド薬塩およびその処方物に良好な影響を及ぼした。従つて、一定の薬理学的活性のペプチドは、‘ペギル化(pegylated)’できることが知られており、この場合、ペプチドの薬理学的活性が保持されているような方法で、ポリエチレングリコールまたはアルコキシーポリエチレングリコールと共に結合させられる。

従つて、共役結合させられたポリエチレン鎖のペギル化されたペプチド分子中の存在は、ペギル化されたペプチドをポリエステルまたはコポリエステルと部分的に相容性にする。

従つて、ペギル化されたペプチド中に残留するリジンまたはアルギニン残分は弱酸の塩として生じる場合には、この相容性は、放出の制御の他の要因を加えるのと同様にポリエステルーペプチド薬塩の調製を簡易化する。また、ペプチドと、他の水溶性ポリマー、例

えば多糖類、合成ポリペプチドおよびポリビニルピロリドンとの薬理学的に活性の共役結合は有用であるが、しかし、前記の後者の水溶性のポリマーは、ポリエステルまたはコポリエステル可溶性であるかまたは相容性であるのであまり好ましくはない。

有利に、本発明は、塩基性官能価薬理学的に活性の薬に当てはまる。しかしながら、薬理学的に活性であり、かつ中性かまたは広くポリアニオンとして存在する傾向があるペプチド（過剰量のカルボン酸官能価を有するポリペプチド）に当てはめることもできる。

前記の例の第一には（この場合、酸性残分も塩基性残分も含有していない薬理学的に活性の中性ポリペプチド）、塩基性官能価を有しつつ薬理学的に不活性である合成ポリペプチドおよびポリエステルの塩が使用される。薬理学的に不活性の合成ポリペプチドおよびポリエステルまたはコポリエステルのこの種の塩は、両親媒溶性であり、同様に、有機相中で薬理学的に活性であるが、しかし、中性のペプチドを溶解するかまたはコロイド状に分散させる分散剤として作用することができる。

前記の場合の第二には（この場合、薬理学的に活性のポリペプチドは、残留力

ルポン酸官能価を有し)、合成ポリペプチド鎖中に少なくとも2個の塩基性基を有し、かつ薬理学的に不活性である合成ポリペプチドおよびポリエステルまたはコポリエステルの塩が使用

される。この第二の場合、合成ポリペプチドおよびポリエステルの塩の中で、該塩中の塩基性官能基の濃度は、酸性の薬理学的に活性のペプチド中のカルボン酸基の濃度を上廻っている。こうして、塩の中の過剰量の塩基性官能価は、酸性の薬理学的に活性のペプチドのカルボン酸基を用いて更に塩を形成することによって相互作用することができる。こうして、生じた塩の錯体は、通常、ペプチドのための全体の非溶剤は問題にされないが、しかし、ポリエステルまたはコポリエステルのための溶剤である有機溶剤または相中に、他のポリエスチルーペプチド塩のための上記の方法で溶解されるかまたは分散されてもよい。

ポリエステルとの塩基性の官能価を有するペプチドおよびカルボン酸官能価を有するコポリエステルの塩は、両親媒溶性なので、その界面活性能は、他の親水性薬の分散液またはこの種の薬の水性懸濁液を簡易化するために、ポリエステルーペプチド塩を含有する有機溶剤または相中で使用することができる。ペプチドと、ポリエステルまたはコポリエステルとのこの種の両親媒溶性の塩の分散剤または可溶化剤としての使用は、本発明のもう1つの特徴を形成する。

本発明は、以下の実施例によって説明されるが、本発明はそれによって制限されるものではない。

粘度の測定および分子量を平均にされた変法に対する該粘度の関係は、SorensenおよびCampbell、“Pr

eparative Methods of Polymer Chemistry” 第2版、1968年、Interscience Division of John Wiley、第43～50頁中で検討されている。以下の本明細書中に記載された実施例の場合、約100秒のクロロホルムだけのための流量時間を生じるUbbelohde粘度計を使用した。前記のように溶剤として使用されたクロロホルムは、開示された組成範囲に関するベンゼン可溶性およびベンゼン不溶性の双方のための溶剤であった。

約2000Daを上廻る分子量の前記の使用の場合に記載されたポリエステルの分子量および分子量分布を、サイズ排除クロマトグラフィーにより、ポリスチレン標準に対して測定し、この場合、10pmのガードカラムを連続して接続し、かつ備えたPL Gel 3×30cm、10μm混合Bカラム（例えば、Polymer Laboratories、Church Stretton、Shropshire、UK）を使用した。テトラヒドロフランを、40℃で、毎分1mlの標準的な流速で溶剤として使用した。分子量特性を、GPCソフトウエアを有するデータ アナリュシス パッケージ パーキン＝エルマー（Data Analysis Package Perkin-Elmer）7700 プロフェッショナル コンピュータを用いて計算した。

2000Da未満の分子量の測定のためには、サイズ排除クロマトグラフィーは、分子量の測定の好ましい方法ではなく、その代わりに、非水性電位差滴定を、

ポリエステルの分子量または当量を生じさせるために、ポリエステルまたはコポリエステルのカルボン酸含量の直接的測定によって使用することができる。一般に、非水性電位差滴定は、水10v/v%を含有するアセトン中に溶解したポリエステルまたはコポリエステルの周知の重量を用いて実施された。滴定を、稀釈された水酸化ナトリウム溶液を用い、かつラジオメーター（コペンハーゲン、デンマーク）によって供給された装置を用いて実施した。これは、滴定器（T T T 80）およびオートビュレット（A B U 80）、PHメーター（P H M 83）およびラッセルCMAWK電極（Russell CMAWK electrode）からなる。滴定をサー ボグラフ（R E C 80）にプロットし、かつポリマーの分子量は、

$$\frac{w \times 1000 \times f}{v \times n}$$

であり、この場合、

wは、使用したポリマーの分子量であり、

fは、ポリマー鎖1個当たりのカルボン酸基の平均数であり、

vは、使用した水酸化ナトリウムの容量であり、

nは、使用した水酸化ナトリウムの規定度である。

例 1

酢酸ゴセレリン（100.6 mg、遊離塩基としてのペプチド約86 mgに対する当量）と、ポリマー鎖1個当たりに1個の末端カルボン酸基を有し、かつ43000 Daの重量平均分子量および0.08 dl/gの25°Cでクロロホルム中で1w/v%での固有粘度を有し、かつベンゼン中に不溶性の50/50モル%のD,L-ラクチド/グリコリドコポリマー（300.3 mg）とを、無水物の遊離水酢酸（3 ml）中に溶解した。薬とポリマーとの酢酸溶液を、液体窒素に滴下し、かつ凍結した液滴を、24時間で高真空条件下に凍結乾燥させた。凍結乾燥された製品を最終的に50°Cで24時間高真空中に後乾燥させ、酢酸ゴセレリン僅かに約25w/w%（遊離塩基としてのペプチド約22.3 w/w%に対する当量）を含有するポリエステル薬混合物を生じた。

乾燥したポリエステル薬混合物（400 mg）を、ジクロロメタンに添加し、4 mlに增量した。まず、混濁したコロイド混合物が得られるが、1時間経過後に、該混合物は、次第に清澄化して清澄な溶液を形成した。該溶液を、薄膜として流延し、室温で約6時間乾燥させ、次に50°Cで20時間高真空中に乾燥させた。こうして、ポリエステル薬を含有する清澄で透明な薄膜が得られた。

(i) こうして得られた清澄で透明な薄膜（100 m

g）を溶融し、かつ80°Cで圧縮成形して、約0.02 cmの厚さの透明な薄膜を生じさせた。37°Cで24時間水中に浸漬した場合に、水和した薬/ポリマー薄膜の重量は、225 mgに増大した。これとは異なり、同様に処理された単独のポリエステル（100 mg）は、126 mgだけ重量を増大し、酢酸ゴセレリン（25 mg）とポリマー（75 mg）との単純な混合物からなる薄膜（薬をジクロロメタン中のポリマーの溶液に添加し、溶剤を除去し、かつ生じた材料を圧縮成形して、約0.02 cmの厚さの薄膜を生じさせることによって製造した）は、37°Cで水中で24時間の浸漬後に136 mgだけ重量増大した。この実験から、ポリエステル薬の塩組成物は、単独のポリエステルまたは薬とポリエステルとの単純な混合物よりもはるかに親水性であり、高い水吸収量を有することは明らかである。

ジクロロメタン中の薬とポリマーとの単純な混合物の場合、該薬は、1か月後でさえも、溶解の兆候を示さず、乾燥されかつ圧縮成形された場合、この単純な混合物は、不透明な薄膜を生じた。しかしながら、他の実験の場合、上記により得られた清澄で透明な薄膜(100mg)は、ジクロロメタン(1ml)中に溶解して、清澄で透明なポリエステル薬溶液を生じた。この溶液に、トリフルオロ酢酸(50μl)を添加し、かつ該混合物を強力に攪拌した。ゴセレリンがトリフ

ルオロ酢酸塩として直ちに沈殿した。

前記の2つの実験は、上記のようにして得られたポリエステル薬の塩を含有する清澄で透明な薄膜が、常用の溶融ポリマーニー二次加工技術を用いる成形輸送系に加工することができることを示す。更に、前記製品は、ほとんど酢酸または酢酸塩のアニオンを含有せず、同様に該薬は、ポリエステルの塩の形で存在しなければならない。このポリエステル薬の塩は、コポリマー上の末端の乳酸またはグリコール酸の基が、酢酸よりもはるかに強い酸であり、同様に弱い酢酸がポリマーによって代替されているので発生する。ジクロロメタン可溶性ポリエステル薬の塩中のポリマーのカルボン酸は、交互に、極めて強力なカルボン酸、例えばトリフルオロ酢酸によって代替されうる。このことが生じる場合、ペプチドのトリフルオロ酢酸塩が形成され、これは、ジクロロメタン中に不溶性であるので沈殿しなかった。

(ii) ポリエステル薬の塩が含有されている上記のようにして得られた清澄で透明な薄膜(50mg)を、成形して、約0.02cmの厚さの薄膜を生じた。該薄膜を、磷酸塩で緩衝した塩水(アゾ化ナトリウム0.02%を含有する)中、pH7.4および37℃で恒温保持し、緩衝溶液を、放出されたゴセレリンの量を測定するためにUVによって周期的に評価した。連続的に約2週間を超えて3週間までにはゴセレリンを放出

した成形製品は、ほとんど完全に崩壊し、培養液(incubation medium)から姿を消してしまった。

この実験は、短時間の間隔で薬の輸送のための極めて低い分子量のベンゼン不溶性ポリマーの有用性を実証する。

同様に成形された調製物は、酢酸ゴセレリンの代わりに、天然に生じる性腺刺激ホルモン放出ホルモンまたは性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する（アゴニストまたはアンタゴニストの）合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか；または完全な性腺刺激ホルモンまたは性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御する任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例 2

上記例 1 中で得られた清澄で透明な薄膜製品（100 mg）と、121000 Da の重量平均分子量および0.84 dl/g の25°Cでクロロホルム中で1w/v %での固有粘度を有し、かつベンゼン中に不溶性の50/50モル%のD,L-ラクチド/グリコリドコポリマー（1.05 mg）とをジクロロメタン（100 ml）中に溶解した。この溶液を、毎分1000回転（rpm）で強力に攪拌し、シリコーン油（50

m l）を1時間で緩徐に添加し、ポリエステル薬の塩と遊離ポリエステルの双方を沈殿させた。1時間後に、部分的に沈殿したポリエステル薬の塩、遊離ポリエステル、シリコーン油およびジクロロメタンを、強力に攪拌されたヘキサン（2リットル）に添加し、ポリエステル薬の塩および遊離ポリエステルの微粒子を硬化させた。この混合物を2時間攪拌し、次に沈降させ、ヘキサン層を廃棄した。この微粒子（遊離塩基としてのゴセレリン約1.95 w/w %を含有する）を、新しいヘキサン（500 ml）で3回洗浄し、最終的に、濾別しあつ35°Cで24時間高真空中に乾燥させた。遊離ポリマー中のポリエステル薬の溶液からなるこうして得られたほぼ球形の微粒子の平均寸法は、約30 μmであった。

この製品の一部分（250 mg）を、磷酸塩で緩衝された塩水（アゾ化ナトリウム0.02%を含有する）中、pH 7.4 および37°Cで恒温保持し、かつ該緩衝溶液を、放出されたゴセレリンの量を測定するためにUVによって周期的に

評価した。約5週間を超えて7週間までには薬を放出した微粒子は、培養液からほとんど姿を消してしまった。

この実験で使用されたポリマー組成物は、同じラクチド／グリコリド組成物の2つのコポリマーの混合物であるが、しかしこの場合、大きく異なる分子量を有し、本明細書に記載されたような混合物と同様に、ベ

ンゼン中に不溶性であり、108000Daの重量平均分子量、5.1の多分散度および0.72dl/gの25℃でクロロホルム中で1w/v%での固有粘度を有していた。

前記の実験は、5～7週間の相対的に短い期間に亘るゴセレリンの放出についての高い分子量および高い多分散度を有するベンゼン不溶性ポリエステルの有用性を示す。

同様に微粒子調製物は、酢酸ゴセレリンの代わりに、天然に生じる性腺刺激ホルモン放出ホルモンの類縁物または性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する（アゴニストまたはアンタゴニストの）合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか；または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御するかまたは変性する任意の他のペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例3

酢酸ゴセレリン（101mg、遊離塩基としてのゴセレリンの約86mgに対する当量）と、ベンゼン中に可溶性であり、約5400Daの重量平均分子量、0.08dl/gの25℃でクロロホルム中で1w/v%での固有粘度および1.8の多分散度を有する1

00モル%のポリ(D,L-乳酸)（299.7mg）とを、無水物の遊離冰酢酸(4ml)中に溶解した。ゴセレリンとポリエステルとのこの酢酸溶液を、液体窒素に滴下し、かつ凍結した液滴を単離し、真空下に24時間で凍結乾燥させ

、次に55℃で24時間高真空中に乾燥させた。

(i) 生じた乾燥製品を、ジクロロメタン(4ml)に添加し、混濁した混合物を最初に生じさせ、迅速に溶解して、清澄な溶液を生じさせ、0.2μmのナイロンの滅菌フィルターを通して濾過した。

この実験は、ポリエステルの有機溶液中の単純な薬の塩の混合物または分散液とは異なり、ゴセレリンのポリエステル塩の溶液が滅菌濾過できることを示す。

(ii) トリフルオロ酢酸(50μl)を、上記(i)からの清澄なジクロロメタン溶液(1ml)に強力に攪拌しながら添加した。ゴセレリンがそのトリフルオロ酢酸塩として直ちに沈殿し、この場合、ゴセレリンは、ジクロロメタン溶液中にカルボキシ末端のポリエステルとの塩として存在していたことを示す。

同様に滅菌溶液調製物は、酢酸ゴセレリンの代わりに、天然に生じる性腺刺激ホルモン放出ホルモンまたは性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する(アゴニストまたはアンタゴニストの)合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか;または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御するかまたは変性する任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例4

例3中で得られたゴセレリン-ポリエステルのジクロロメタン溶液(2ml)を、更にジクロロメタンで稀釈し、10mlに增量した。この溶液を、強力に攪拌されたヘキサン(1リットル)中に噴霧して、単離しあつ真空下に45℃で24時間乾燥させた後、約2μm~約30μmの寸法の範囲、約10μmの平均寸法を有する微粒子を生じた。前記の微粒子のゴセレリン含量は、遊離塩基としての約22%に対する当量であった。

前記微粒子を、磷酸塩で緩衝して37℃でpH7.4にされた塩水中で恒温保持し、上清を、ゴセレリンについてUVによって周期的に評価した。ゴセレリンは連続的に放出され、放出は、約8週間までに本質的に完結し、11時間までに

は微粒子は、全体的に崩壊し、培養液から姿を消してしまった。この実験は、約2か月に亘る連続的なペプチド放出が得られる極めて低い分子量のベンゼン可溶性ポリエステルの有用性を示す。

上記の実験中の酢酸ゴセレリンが、トリフルオロ酢

酸によって代替される場合、清澄な溶液は得られないが、その代わり、ジクロロメタン中のポリエステル溶液は、本質的にゴセレリントリフルオロ酢酸の分散液を含有する。この混合物は、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターを通過しないし同様に滅菌濾過することができず；このようなポリエステル溶液中のゴセレリントリフルオロ酢酸の分散液を、攪拌されたヘキサン中に噴霧した場合には、微粒子よりもむしろ凝結させかつ凝集させた物質が生じた。

従って、ゴセレリン一ポリエステル塩は、極めて低い分子量のポリマーの溶液中の単純な塩の混合物よりも、はるかに容易に微粒子形中に調製する性質を有する。

同様の微粒子調製物は、酢酸ゴセレリンの代わりに、天然に生じる性腺刺激ホルモン放出ホルモンまたは性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する（アゴニストまたはアンタゴニストの）合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか；または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御するかまたは変性する任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例5

酢酸ゴセレリン（304mg、遊離塩基としてのゴセレリンの約248mgに対する当量）と、約5400の重量平均分子量、 0.08 dl/g の25°Cでクロロホルム中で 1 w/v\% での固有粘度および1.8の多分散度を有する100モル%のポリ（D, L-乳酸）102mg）を、無水物の遊離水酢酸（2ml）中に溶解した。次にゴセレリンとポリエステルとの酢酸溶液を、液体窒素に滴下し、かつ凍結した液滴を単離し、高真空中に24時間で凍結乾燥させ、次に真空

下に55℃で24時間乾燥させた。

生じた製品をジクロロメタン(2ml)に添加し、全体的に清澄でなかった混濁したコロイド混合物を次第に生じた。ジクロロメタン中のこの混合物は、本質的に、ゴセレリン-ポリエステル中の酢酸ゴセレリンの分散液からなっていた。

ポリエステル-ゴセレリンの塩化メチレン溶液中の酢酸ゴセレリンの分散液を、遊離塩基としての約72w/w%に対する当量のゴセレリンを含有する微粒子形の中に調製させ、この場合、遊離酢酸ゴセレリンは、噴霧乾燥、噴霧凝結、単純沈降または相分離コアセルベーションによって、ゴセレリン-ポリエステル塩の連続相の至る所に分散している。

同様に微粒子調製物は、酢酸ゴセレリンの代わりに、天然に生じる性腺刺激ホルモン放出ホルモンまたは性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する

(アゴニストまたはアンタゴニストの)合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか;または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御するかまたは変性する任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例6

D, L-乳酸78%およびグリコール酸22%のモル組成を有するD, L-乳酸およびグリコール酸のコポリエステルを、2個のヒドロキシ酸の共重縮合によって製造した。コポリエステルの沈殿のためのメタノールへのアセトン中のコポリエステルの溶液の添加および沈殿した材料を分離および乾燥による該コポリマーの精製後に、該コポリエステルは、約11000Daの重量平均分子量、6100Daの数平均分子量(非水性の電位鎖滴定によって測定され、かつそれぞれのコポリエステル鎖が1個だけの末端カルボン酸基を有することを評価するもの)、従って、1.6の多分散度および0.15dl/gの25℃でクロロホルム中で1w/v%での固有粘度を有していた。

酢酸ゴセレリン(228.9mg、遊離塩基としてのゴセレリンの約200m

g に対する当量)と、上記のコポリエステル(1.8 g)とを、無水物の遊離水

酢酸(10 ml)中に溶解した。こうして得られたゴセレリンーポリエステル溶液を、液体窒素に滴下し、かつ凍結した液滴を単離し、24時間で凍結乾燥させ、次に最終的に、50°Cで24時間真空下に乾燥させた。

乾燥したゴセレリンーポリエステル混合物を、ジクロロメタン(10 ml)に添加し、まず、混濁したコロイド混合物が生じたが、24時間後に該混合物は、0.2 μmのナイロンの滅菌フィルターを通して濾過することができた清澄な溶液に変化した。

トリフルオロ酢酸を、この清澄な溶液の小さなアリコートに添加し、ゴセレリンがそのトリフルオロ酢酸塩として直ちに沈殿し、この場合、清澄で透明なジクロロメタン溶液中に、ゴセレリンーポリエステル混合物中のゴセレリンは、大部分または全てがポリエステルとの塩として存在していたことを示す。

ゴセレリンーエステル塩のジクロロメタン溶液を乾燥するまで蒸発させ、生じた固体を室温で6時間乾燥させ、次に55°Cで20時間真空下に乾燥させて、ゴセレリンーポリエステル塩を含有する清澄な流延薄膜を生じた。

上記のようにして得られた乾燥したゴセレリンーポリエステル混合物(1 g)を、ジクロロメタン8 ml中に溶解した。生じた溶液を、250 mlの多口型丸底フラスコ中に入れ、窒素の流れで一掃して全ての空気を除去し、二酸化炭素を含有しない雰囲気を生じさ

せた。予め脱ガスして全ての二酸化炭素を除去し、次に二酸化炭素を含有しないで窒素を供給された水(90 ml)をフラスコの中に導入し、かつ該混合物を本質的に二酸化炭素を含有していない雰囲気下に約500 rpmで強力に攪拌した。ゴセレリンーポリエステル塩のジクロロメタン溶液を迅速に拡散させ、安定性の水中油(薬-ポリマーの塩のジクロロメタン溶液)形分散液を生じた。約200 rpmで攪拌し続ける間、次第に真空に引き、かつジクロロメタンのばら荷を真空下で蒸発させ、水中のゴセレリンーポリエステルの塩の分散液を生じた。この分散液を凍結乾燥して、ゴセレリンが約20 pmの平均粒度を有するゴセレリ

ン-ポリエステルの塩として存在する微粒子を生じ、該微粒子は、磷酸塩で緩衝して37℃でPH7.4にされた塩水中で恒温保持し、上清をゴセレリンについてUVによって周期的に評価した場合、ゴセレリンを約6週間に亘って放出することを示した。

また、同様に微粒子を、マンニトールのようなポリペプチドの安定性を向上させることが知られている水相助剤中に組み込むことによって製造してもよい。二酸化炭素を含有しない雰囲気中で上記方法を実施することは好ましいが、それでもやはり、二酸化炭素の痕跡の存在下に十分な結果を達成することも可能であり、この場合、ポリエステルの分子量および薬負荷量に左右される。

同様に滅菌された溶液、流延薄膜および微粒子の調製物を、同様の方法で、酢酸ゴセレリンの代わりに、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの天然の類縁物または他の高い能力を有する（アゴニストまたはアンタゴニストの）合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか；または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御するかまたは変性することができる任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例7

例5中に記載された手順を繰り返して、清澄で透明な薄膜を生じさせ、この薄膜（1g）を、ジクロロメタン（4ml）中に溶解した。この溶液を約35℃に昇温させ、次に水（100μl）中の精製されたゼラチンの水溶液を、約40℃で、ゴセレリン-ポリエステル塩のジクロロメタン溶液に添加し、該混合物を35℃で強力に攪拌して、ゴセレリン-ポリエステル塩のジクロロメタン溶液中のゼラチン水溶液の極端に微細な分散液を生じた。室温に冷却する際に、懸濁液のコロイドの性質を維持していた。

この実験は、ゴセレリン-ポリエステル塩が界面活性の性質を有し、他の水溶性の薬剤、例えばゼラチン、

多糖類および他の親水性ポリマーの水溶液の油相中、例えばジクロロメタン中に安定性の分散液を生じさせるために使用することができるかまたはその反対を示す。

例6中に記載された方法を繰り返して、上記のゴセレリンーポリエステル塩のジクロロメタン溶液中の水性ゼラチンの分散液を使用して、ゼラチンおよびゴセレリンーポリエステル塩の双方を含有するマイクロカプセル製品を生じた。

他の低分子量の化合物を、水性ポリマー相中に組み込んでもよい。特に、ペプチドの安定性を向上させることができているマンニトールのような化合物を包含することはしばしば有用である。また、前記安定剤を、ゴセレリンーポリエステル塩のジクロロメタン溶液中に分散した水性ゼラチンからなる複合水中油中水形分散液と、更に水中に分散している生じた油中水形分散液との双方の水相中に組み込んでもよい。

同様に懸濁液および微粒子調製物を、同様に酢酸ゴセレリンの代わりに、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する（アゴニストまたはアンタゴニストの）類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか；または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制

御するかまたは変性することができる任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例8

酢酸ゴセレリン（771mg、遊離塩基としてのゴセレリンの約670mgに対する当量）、約3600Daの重量平均分子量および0.08dl/gの25℃でクロロホルム中で1w/v%での固有粘度を有する95/5モルのD,L-ラクチド/グリコリドコポリマー（1.8g）と、約15000Daの重量平均分子量および0.17dl/gの25℃でクロロホルム中で1w/v%での固有粘度を有する95/5モルのD,L-ラクチド/グリコリドコポリマー（4.2g）とを、無水物の遊離水酢酸（70ml）中に溶解した。合わせたポリマーは

、約12300Daの重量平均分子量および約2.6の多分散度を有していた。ゴセレリンーポリエステル溶液を、液体窒素に滴下し、かつ凍結した液滴を単離し、高真空中に18時間で凍結乾燥させた。薬ーポリマー混合物の製品を、最終的に55℃で24時間で高真空中に乾燥させた。

乾燥した薬ーポリマー混合物(6g)を、ジクロロメタン(60ml)に添加し、まず、混濁したコロイド混合物を生じ、該混合物は、1時間経過後に、次第に清澄化してジクロロメタン中のゴセレリンーポリエステル塩の清澄な溶液を生じた。

この溶液を、60℃の入口温度および35℃の出口

温度を用いるブチ(Buchi)噴霧乾燥器を用いて、噴霧乾燥して、直径約1μm～約10μmのほぼ球形の微粒子を生じさせた。

この微粒子中で、薬は、酢酸含量が、遊離酸またはアニオンとして、ゴセレリンがその酢酸塩として存在している場合に必要とされるような0.6～0.7%の代わりに0.06%以下であるので、本質的に完全にゴセレリンーポリエステル塩として存在する。

この微粒子は、80℃で圧縮成形によって更に加工した場合には、清澄で透明でかつ脆い薄膜を生じた。

この実験は、低分子量および場合によっては高い多分散度のポリマーのベンゼン可溶性ポリエステルを用いるペプチド塩の有用性を示す。

同様に溶液、微粒子および成形された調製物を、酢酸ゴセレリンの代わりに、天然に生じる性腺刺激ホルモン放出ホルモンまたは性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する(アゴニストまたはアンタゴニストの)合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ロイプロレイン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか；または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御するかまたは変性する任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例9

酢酸ゴセレリンおよび性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する合成のアゴニストを、男性の場合の前立腺癌および女性の場合の閉経前の乳癌のようなホルモンに左右される癌の処置に使用される選択性の化学的去勢剤である。また、この薬は、女性の場合の悪性でない婦人科の症状の処置に使用され、該薬は、下垂体による性腺刺激ホルモンの分泌を最終的に抑制することによって作用し、また更に性ホルモン、例えば雌のエストロゲンおよび雄のテストステロンを抑制させる。

従って、この種の薬の連続的に継続された放出を、規則的な発情周期を有する標準的な成体の雌のラットの場合に生体内で評価することができる。この動物の場合、発情周期は約4日であり、発情の発生は、発情の日に生じた臍の標本の中の僅かに角質化した細胞の存在によってのみ明らかにされる。この動物がゴセレリンのような薬によって化学的に去勢されている場合には、発情は生じず、この場合、臍の標本の中に角質化した細胞の欠如を生じる。この動物たちは、化学的去勢によって誘発された延長された発情静止期に入り、発情静止期は、薬の有効量が放出されるのと同じ長さで維持される。

(i)

例8中で得られた微粒子(450mg)を、ナトリウムカルボキシメチルセルロース2w/v%およびポ

リソルベート80 0.2w/v%を含有する水の中に分散させ、かつ水で3mlに增量した。0.2ml(遊離塩基としてのゴセレリンの約3mgに対する当量)を、規則的な周期を示す10匹の標準的な成体の雌のラットに皮下注射し、その後の発情周期に対する作用を、臍の標本の顕微鏡検査によって測定した。この動物たちは、95±3日間継続する化学的去勢である発情静止期の連続段階に入った。

この実験は、低分子量のベンゼン可溶性ポリエステルを基礎とするゴセレリン-ポリエステル塩の水性懸濁液の調製物が、僅か4~6時間の代謝半減期を有するペプチド薬の約3か月の制御された放出の相対的に長い期間を提供することを示す。

(i i) 例8中で得られた微粒子 (450mg) を、オレイン酸エチルの中に分散させ、かつ3mlに增量した。再度、調製物の0.2mlを、規則的な周期を示す(6匹)の雌のラットに皮下注射によって投与した。この動物たちは、81±3日間継続する発情静止期の連続段階に入った。

この実験は、ポリエステルだけには不溶性である有機注射用ビヒクル中のゴセレリンーポリエステル塩の溶液調製物が、制御されたペプチド薬の放出の相対的に長い期間を提供することを示す。

例10

酢酸ロイプロレリン (50.3mg) と、上記例6中

に記載された78モル%のD, L-酪酸および22モル%のグリコール酸からなるコポリエステル (453.2mg) とを、無水物の遊離水酢酸 (5ml) 中に溶解した。生じた溶液を、液体窒素に滴下し、かつ凍結した液滴を、高真空中で22時間で凍結乾燥させ、次に更に、55℃で24時間で高真空中に乾燥させた。

生じた製品 (500mg) を、100mlの丸底フラスコ中の再蒸留したアセトン (10ml) 中に溶解させ、まず、混濁したコロイド混合物を生じ、該混合物は、次第に清澄化して透明な溶液になった。このアセトンを真空中に蒸発させ、かつ生じた清澄な薄膜を、55℃で4時間高真空中に乾燥させた。ロイプロレリンーポリエステル塩の前記の薄膜を、アセトン (10ml) 中に再溶解し、該溶液を脱ガスし、次に窒素で一掃した。

新たに蒸留した水 (200ml) を窒素雰囲気下に強力に攪拌し、ロイプロレリンーポリエステル塩のアセトン溶液を、攪拌された水の表面に噴霧した。全てのアセトン溶液を噴霧した場合、攪拌を更に1時間続け、次に該混合物を沈降させた。ロイプロレリンーポリエステル塩の微粒子が沈降し、かつ水性上清を廃棄した。該微粒子を、二酸化炭素不含の水の更に少量 (~200ml) 中に再懸濁し、該懸濁液を窒素雰囲気下に更に1時間攪拌した。この微粒子を、まず、混合物を沈降させ、水層を傾瀉し、次に残分を濾過して

過剰量の水から微粒子を分離することによって分離した。この微粒子を位、30℃で24時間高真空中に乾燥させて、約 $15\text{ }\mu\text{m}$ の平均粒度を有する製品を生じた。

ロイプロレリン-ポリエステル塩の前記の微粒子調製物を、磷酸塩で緩衝して37℃でPH7.4にされた塩水中で恒温保持し、かつ上清を、ロイプロレリンについてUVによって周期的に評価した。ロイプロレリンを、調製物が全体的に崩壊するまでの時間、約5週間連続的に放出した。

同様に微粒子調製物を、ロイプロレリンの代わりに、天然に生じる性腺刺激ホルモン放出ホルモンまたは性腺刺激ホルモン放出ホルモンの他の高い能力を有する（アゴニストまたはアンタゴニストの）合成の類縁物、例えばトリプトレリン、ゴセレリン、ブセレリンおよびナファレリンを、有利には、酢酸塩または他の弱酸との塩として使用して製造することができるか；または完全な性腺刺激ホルモンまたは個々の性腺刺激ホルモンサブユニットの分泌物を制御する任意の他のポリペプチドホルモンを使用して製造することができる。

例11

i) 酢酸ゴセレリン（2.28g、遊離塩基としてのゴセレリンの約2.00gに対する当量）を、無水物の遊離水酢酸（60ml）中に溶解した。2成分系の95/5モル%のポリ（D,L-乳酸）/（ポリグリ

コール酸）コポリマー（15846の重量平均分子量および1.38の多分散度を有するコポリマー12.6gおよび3896の重量平均分子量および1.78の多分散度を有するコポリマー5.4g）の混合物（従ってこの場合、塩基性薬に関してコポリマーのカルボン酸末端基の過剰量が得られる）を、攪拌しながら無水物の遊離水酢酸（150ml）中に溶解して、清澄な溶液を生じた。この薬溶液をコポリマー溶液に添加し、完全に混合した。次にこの混合物を、液体窒素に滴下して凍結させ、小さなビーズ状物にし、固体材料を、エドワーズハイバキュームフリーズドライヤー（Edwards high vacuum freeze drier）を用いて2日間で凍結乾燥させた。更に、乾燥した材料を、50~55℃で真空炉中で24時間で乾燥させた。

この乾燥された製品 (100 mg) を、ジクロロメタン (1 ml) に添加し、かつ全部で2時間で溶解して、清澄な溶液を生じた。ポリエステルーゴセレリン塩の組成物が、薬に、該薬が非極性溶剤中に溶解できるような良好な可溶性を付与することがこの実施例によって示されている。

i i) 酢酸ゴセレリン (2.28 g、遊離塩基としてのゴセレリンの約2.00 gに対する当量) を、無水物の遊離水酢酸 (60 ml) 中に溶解した。2成分系の100モル%のポリ (D, L-乳酸) ポリマー (重量平均分子量 15178 および 1.27 の多分散度を

有するポリマー 12.6 g および重量平均分子量 4204 および 1.84 の多分散度を有するポリマー 5.4 g) の混合物 (従ってこの場合、塩基性薬に関してコポリマーのカルボン酸末端基の過剰量が得られる) を、攪拌しながら無水物の遊離水酢酸 (150 ml) 中に溶解して、清澄な溶液を生じた。該薬溶液を、ポリマー溶液に添加し、入念に混合し、次にこの混合物を、液体窒素に滴下して凍結させ、小さなビーズ状物にした。この固体材料を、エドワーズ ハイ バキューム フリーズ ドライヤーを用いて2日間で凍結乾燥させ、更に、乾燥した材料を、50~55°Cで真空炉中で24時間で乾燥させた。

この乾燥された製品 (100 mg) を、ジクロロメタン (1 ml) に添加し、かつ全部で2時間で溶解して、清澄な溶液を生じた。ポリエステルーゴセレリン塩の組成物が、薬に、該薬が非極性溶剤中に溶解できるような良好な可溶性を付与することがこの実施例によって示されている。

i i i) 酢酸ゴセレリン (2.28 g、遊離塩基としてのゴセレリンの約2.00 gに対する当量) を、無水物の遊離水酢酸 (60 ml) 中に溶解した。80/20モル%のポリ (D, L-乳酸) / (ポリグリコール酸) コポリマー (重量平均分子量 106510 および 2.27 の多分散度を有するコポリマーの 12.6 g) と、95/5モル%のポリ (D, L-乳酸) / (ポリ

グリコール酸) コポリマー (重量平均分子量 3896 および 1.78 の多分散度を有するコポリマーの 5.4 g) との混合物 (従ってこの場合、塩基性薬に関し

てコポリマーのカルボン酸末端基の過剰量が得られる)を、攪拌しながら無水物の遊離水酢酸(150ml)中に溶解して、清澄な溶液を生じた。該薬溶液を、コポリマー溶液に添加し、かつ入念に混合した。次にこの混合物を、液体窒素に滴下して凍結させ、小さなビーズ状物にし、この固体材料を、エドワーズハイバキュームフリーズドライヤーを用いて2日間で凍結乾燥させ、更に、乾燥した材料を、50~55℃で真空炉中で24時間で乾燥させた。

この乾燥された製品(100mg)を、ジクロロメタン(1ml)に添加し、かつ全部で2時間で溶解して、清澄な溶液を生じた。ポリエステルーゴセレリン塩の組成物が、薬に、該薬が非極性溶剤中に溶解できるような良好な可溶性を付与すること尾がこの実施例によって示されている。

i v) 酢酸ゴセレリン(2.17g、遊離塩基としてのゴセレリンの約1.90gに体する当量)を、無水物の遊離水酢酸(60ml)中に溶解した。2成分系の67/33モル%のポリ(D,L-乳酸)/(ポリグリコール酸コポリマー(35833の重量平均分子量および1.83の多分散度を有するコポリマー12.0gおよび4.116の重量平均分子量および1.8

6の多分散度を有するポリマー5.15g)の混合物(従ってこの場合、塩基性薬に関してポリマーのカルボン酸末端基の過剰量が得られる)を、攪拌しながら、無水物の遊離水酢酸(150ml)中に溶解して、清澄な溶液を生じた。該薬溶液を、コポリマー溶液に添加し、かつ入念に混合した。次にこの混合物を、液体窒素に滴下して凍結させ、小さなビーズ状物にした。この固体材料を、エドワーズハイバキュームフリーズドライヤーを用いて2日間で凍結乾燥させ、更に、乾燥した材料を、50~55℃で真空炉中で24時間で乾燥させた。

比較例

ゴセレリンアセテート(2.28g、遊離塩基としてのゴセレリン約2.00gと等量)を無水物不含の冰酢酸(60ml)に溶解した。50/50モル%のポリ(D,L-酪酸)/(ポリグリコール酸)コポリマー(重量平均分子量22307および多分散度2.07を有するポリマー18.0g、したがってこの場

合には、塩基性薬に対してコポリマーカルボン酸末端基のほぼ化学量論的当量を生じる) を攪拌しながら無水物不含の冰酢酸(150ml)に溶解し、澄明な溶液を生じた。この薬溶液をコポリマー溶液に添加し、十分に混合した。次に、この混合物を液体窒素に滴加し、小さいビーズ状物として凍結乾燥した。この固体物質をエドワーズ(Edwards)高真空凍結乾燥器を使用することにより2日間凍結乾燥し、さらにこの乾燥した物質を真空炉中で50~55°Cで24時間乾燥した。

この乾燥した生成物(100mg)をジクロロメタン(1ml)に添加し、4時間後に全部は溶解しなかったが、しかし強制的に溶解させ、4日後に澄明な溶液を形成させた。本例の場合には、ポリエステルーゴセレリン塩を非極性溶剤に溶解することができるよう程度に薬の下で良好な溶解性を与えるために、ポリエステルーゴセレリン塩の形成は、コポリマーカルボン酸末端基が塩基性薬に対して過剰量で存在する場合に直ちに発生することが示されている。

乾燥した生成物i~ivをジクロロメタンに溶解し、次表に示されているように、ブチ(Buchi)190ラブスケール(lab scale)噴霧乾燥器を使用することにより噴霧乾燥した:

生成物	生成物対 溶剤の割合%	入口温度	出口温度
		°C	°C
i	1 0	4 8	3 2
ii	1 0	5 8	3 8
iii	2	5 8	4 4
iv	1 0	5 5	3 5

生成物i~ivを噴霧乾燥することにより、走査電子顕微鏡によって測定されたように約1~10μmの直径を有する小さい粒子を生じた。最終的な粒子を約0.03%の検出限界を有するガスクロマトグラフィー検定を使用することにより酢酸含量について検定した。この検定を使用することにより、この配合物中に

は酢酸は存在しないことが測定され、このことにより、薬はポリエステル塩として存在し、酢酸塩としては存在しないことが証明され、それというのも約0.5%の酢酸濃度は酢酸塩について予想されるものであるからである。

上記の噴霧乾燥した粒子(50mg)をジクロロメ

タン(0.5ml)に溶解し、澄明な溶液を生じた。1滴のトリフルオロ酢酸をそれぞれの溶液に添加し、この結果そのつど白色の沈殿物を形成させた。試料を遠心分離し、沈殿物を捕集し、この沈殿物をジクロロメタンで洗浄した。HPLC分析により、沈殿した物質はゴセレリンであることが判明した。本例は、強酸の添加により薬を非極性溶剤中の溶液の薬-ポリエステル塩によって代替することができ、このことにより、非極性溶剤中の薬の溶解性をペプチド薬の酸塩の予想される溶解性に戻すことができる（即ち、非可溶性）。

例12

例11中の噴霧乾燥した粒子i~ivを注射に適当な水性ビヒクル（ナトリウムカルボキシメチルセルロース2% [フルカ(Fluka)、中位の粘度]、ポリソルベート(polysorbate)80 0.2% [トゥイーン(Tween)（登録商標）、フルカ]）中に分散させた(18w/v%)。

上記の注射用ビヒクル中に分散させた例11からの噴霧乾燥した粒子を10匹の雌のウイistar(Wistar)産のラットに注射した。血液試料を7日目、14日目および28日目に5匹のラットの尾から採取し、これらの試料をラジオイムノアッセイを使用することにより薬に対して知られた特異性でゴセレリンについて検定し、かつ代謝物に対する異種反応性が欠如している

ことを証明した。

この実験の結果により、この配合物は、少なくとも4週間でゴセレリンの測定可能な血液濃度を達成することが判明した。

例13

例11の噴霧乾燥した生成物iiを次の注射用の水性ビヒクル中に分散させた。

a. ナトリウムカルボキシメチルセルロース（中位の粘度、フルカ（Fluka））
 1. 0 % およびポリソルベート（polysorbate）80（トゥイーン（Tween））
 0. 75%。
 b. メチルセルロース（15 mPa·s、フルカ（Fluka））0. 75 % および
 ポリソルベート（polysorbate）80（トゥイーン（Tween））0. 75%。

例 1 4

例 1 1 の噴霧乾燥した生成物 i i (400 mg) をジクロロメタン (4 ml) に溶解した。この溶液を注射器を用いて、2500 rpmで攪拌した水中のポリビニルアルコール（PVA）0. 25 % の溶液（アルドリッヒ（Aldrich）、加水分解した 75 %、分子量 2000）に添加した。2 分後、攪拌速度を 800 rpm に減速させ、攪拌をさらに 30 分間連続させた。次に、攪拌を停止させ、形成された粒子を沈殿させた。PVA 溶液をデカントし、次に粒子を氷で冷やした水で 2 回洗浄し、かつ遠心分離によって回収した。この粒子

を最終的に凍結乾燥によって乾燥させた。最終生成物は、ゴセレリンを含有する微粒状物質であった。

例 1 5

例 1 1 の噴霧乾燥した配合物 i v を 82 °C で押出し、直径約 1 mm の円筒形の押出品を生じた。この押出品を約 36 mg の重量を有しあつゴセレリン約 3. 6 mg を含有する長さに切断した。この押出品は、白色の外観を有しているというよりもむしろ完全に澄明ないし明色であり、この場合この白色の外観は、ペプチドとポリエステルとの塩を形成することなしに生成された、薬とポリマーとの簡単な混合物の典型的なものである（例えば、商業的に入手可能な“Zoladex”デポー剤（depot）、この“Zoladex”は登録商標である）。この押出品の澄明度は、光散乱および白色の外観を生じる分離層の場合よりもむしろペプチドゴセレリンがポリエステル相と相容性であることを示している。この相容性は、ペプチドがポリマーと同じ相である、即ちポリエステルの塩として存在する場合にのみ起こりうる。

1 個のこのようなデポー剤 3. 6 mg を麻酔をかけた 21 匹のウイistarル（Wi

star) 産のラットに移植した。その後の時点で 3 匹の動物の群を死亡させ、デポー剤を回収した。回収したデポー剤を容積測定用のフラスコ中の氷酢酸に溶解し、ポリマーを過剰量の水の添加によって沈殿させた。次に、このポリマーを濾過し

(Millipore 0.5 μm)、濾液を HPLC によって薬含量について検定した。このデポー剤の放出プロフィールを移植せずかつ同じ検定法に包含されるデポー剤の薬含量に関連させて計算した。この薬-ポリエステル塩のデポー剤により、少なくとも 4 週間の期間で生体内のゴセレリンの確認された放出量を生じた。

例 16

(i) 1 個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー (95/5) (8.87 g、分子量 = 5750、多分散度 = 1.5、末端基の滴定による分子量 = 2516 g/mol、クロロホルム中の 1w/v % の固有粘度 = 0.10 dl/g) を攪拌しながらジクロロメタン (50 ml) に溶解した。この溶液にゴセレリンアセテート 1.13 g を添加し、曇った懸濁液を形成させた。メタノール (5 ml) を攪拌しながら添加した。30 分後、この混合物は完全に澄明になった。次に、溶剤を回転蒸発によって溶液から除去し、透明な固体を留めた。この固体をジクロロメタン (50 ml) に再溶解し、溶剤を再び回転蒸発によって除去した。再溶解工程および溶剤除去工程をさらに 2 回繰り返し、著しく粘稠な液体を留め、高真空下に乾燥させ、白色のフォームを生じた。このフォームを破壊し、室温でさらに 24 時間真空下に乾燥し、微細な無定形の固体を生じた。

(ii) 上記 i) に記載された方法を、1 個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー (75/25) (8.87 g、分子量 = 10900、多分散度 = 1.85、末端基滴定による分子量 = 3210 g/mol、クロロホルム中 1w/v % の固有粘度 = 0.14 dl/g) を使用することにより繰り返し、微細な無定形の固体を生じた。

処方物 1

上記(i)からのゴセレリンーラクチド／グリコリドポリマー塩(1g)を安息香酸ベンジル(99%、Janssenによる、2ml)に添加し、この混合物を固体が溶解されるまで混合物を攪拌しながら手で持ったホットエアガンを使用して加熱した。この溶液の処方物 $110\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

処方物2

処方物1と同様に行なうが、しかし、溶剤は、安息香酸ベンジル67%(99%、Janssenによる)とベンジルアルコール33%(無水物、99%、Aldrichによる)との混合物であった。この溶液の処方物 $100\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

処方物3

処方物1と同様に行なうが、しかし、溶剤は、ベンジルアルコール(1.7ml、無水物、99%、Aldrichによる)であった。この溶液の処方物 $100\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

処方物4

処方物1と同様に行なうが、しかし、上記(ii)からのゴセレリンーラクチド／グリコリドポリマー塩(1g)および安息香酸ベンジル3mlを使用した。この溶液の処方物 $150\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

処方物5

処方物4と同様に行なうが、しかし、処方物2の溶剤混合物を使用した。この溶液の処方物 $100\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

処方物6

処方物4と同様に行なうが、しかし、処方物3の溶剤を使用した。この溶液の処方物 $100\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

生物学的評価

生体内での上記処方

物1～6からのゴセレリンの放出率を、投与した雌のラットの膣の汚物を毎日調べることによって測定した。標準の発情周期(発情期、間発情期、後続発情期、

前発情期)は、前記汚物中の種々の細胞型(白血球、上皮および角質)の割合から追跡することができる。処方物からの薬の放出が連続的である場合には、標準の発情周期は、中断され、ラットは、ゴセレリンの連続的放出の長さと同様に間発情期に留まる。

処方物1～6をラット1匹当たりゴセレリン3.6mgの投与量で規則的発情周期の雌のラットの群(n=

6)に投与した。20ゲージの針を備えた注射器を処方物の皮下投与のために使用した。投与していない5匹のラットの群を対照群として使用した。膣の汚物を毎日ラットから採取し、動物の発情状態を測定するために検査した。得られた結果は、次の通りであった：

処方物の番号	間発情期の平均的期間(日)			
	(土標準誤差)			
1	1	0	0	± 2.7
2	1	2	0	± 6.3
3	6	9	± 5.9	
4	5	9	± 1.2	
5	6	1	± 2.1	
6	5	3	± 3.7	

この結果から、6つの全処方物により6週間の過剰のゴセレリン放出の期間が生じ、かつ処方物1および2は3カ月以上の期間でゴセレリンを放出したことを見認めることができる。更に、これらの例から、ゴセレリン-ポリエステル塩の処方物を細いゲージを針を用いて直ちに腸管外投与することができる溶液として供給することができ、かつこのような処方物はヒトのホルモン依存性腫瘍の治療に有用であることを認めることができる。

例17

処方物1

例16からの処方物1と同様。

処方物2

例16(i)に記載された方法を、1個の末端カルボン酸基を有するポリアクチドホモポリマー(分子量=5092、多分散度=1.44、末端基滴定による分子量=2270g/mol)およびゴセレリンアセテート(0.46g)を使用することにより繰り返した。この無定形の固体の酢酸含量をガスクロマトグラフィーによって測定し、かつ0.14%であることを見い出した。

このゴセレリンーラクチドポリマー塩(1g)を安息香酸ベンジル(99%、Janssenによる、2ml)に添加し、この混合物を固体が溶解されるまで混合物を攪拌しながら手で持ったホットエアガンを使用して加熱した。この溶液の処方物 $110\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

処方物3

1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー(95/5)(7.86g、分子量=5750、多分散度=1.50、末端基滴定による分子量=2516g/mol)およびゴセレリンアセテート(0.98g)を水酢酸に溶解した。この溶液を液体窒素への滴加によって凍結乾燥し、引き続き2日間凍結乾燥した。次に、生じる固体を40℃でさらに24時間

乾燥した。この凍結乾燥した固体の酢酸含量をガスクロマトグラフィーによって測定し、かつ0.17%であることを見い出した。

このゴセレリンーラクチド／グリコリドコポリマー混合物(1g)を安息香酸ベンジル(2ml、99%、Janssenによる)に添加し、この混合物を固体が溶解されるまで混合物を攪拌しながら手で持ったホットエアガンを使用して加熱した。この溶液の処方物 $110\mu l$ は、ゴセレリン3.6mgを含有していた。

それ故に、ポリエステル塩としてのゴセレリン処方物は、薬の下で良好な可溶性を与え、したがってこの処方物はゴセレリンアセテートそれ自体が溶解しない安息香酸ベンジルのような脂肪好性溶剤に溶解できることを認めることができる。

生物学的評価

処方物1～3を、例16の記載と同様に、ラット1匹当たりゴセレリン3.6 mgの投与量で規則的発情周期の雌のラットの群（n=10）に投与した。投与に引き続き、これらの動物はゴセレリンの連続的放出を示す連続的間発情期に入ることが見い出された。それぞれのラット群の間発情期の平均的期間は、次表中に記載されている。この表から、3つの全処方物により、14週間の過剰のゴセレリン放出期間を生じたことを認めることができる。

処方物の番号	間発情期の平均的期間（日）	
	（±標準誤差）	
1	104	（±5.4）
2	99	（±3.9）
3	101	（±2.8）

更に、これらの例から、ゴセレリン-ポリエステル塩の処方物を細いゲージを針を用いて直ちに腸管外投与することができる溶液として供給することができ、かつこのような処方物はヒトのホルモン依存性腫瘍の治療に有用であることを認めることができる。

例18

処方物1

1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー（95/5）（4.5 g、分子量=6806、多分散度=1.55、末端基の滴定による分子量=3027 g/mol、クロロホルム中の1w/v%での固有粘度=0.108 dl/g）を冰酢酸（50ml）に溶解した。この溶液にゴセレリンアセテート（0.56 g、ゴセレリン0.5 gと等量）を添加し、この混合物を10分間攪拌し、澄明な無色の溶液を生じた。この溶液を液体窒素への滴加によって凍結乾燥し、引き続き2日間凍結乾燥した。次に、生じる固体を40℃でさらに24時間乾燥した。この凍結乾燥した固体の酢酸含量をガスクロマトグラフィーによって測

定し、かつ0.3%であることを見い出した。

このゴセレリンーラクチド／グリコリドコポリマー混合物(1.0g)を安息香酸ベンジル(2.0ml、99%、Janssenによる)に添加し、この混合物を加熱下に攪拌しながら溶解した。最終的溶液は、110μl中ゴセレリン3.67mgを含有し、最終的生成物のゴセレリン含量は、10.0w/v%であった。

処方物2

処方物1について上記した方法を、1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー(95/5)(4.0g、分子量=6011、多分散度=1.56、末端基の滴定による分子量=2700g/mol、クロロホルム中の1w/v%での固有粘度=0.099dl/g)およびゴセレリンアセテート1.12g(ゴセレリン1.0gと等量)を使用することにより繰り返した。この凍結乾燥した固体の酢酸含量をガスクロマトグラフィーによって測定し、かつ0.83%であることを見い出し、最終的生成物のゴセレリン含量は、19.46w/w%であった。

このゴセレリンーラクチド／グリコリドコポリマー混合物(0.54g)を安息香酸ベンジル(2.46ml、99%、Janssenによる)に添加し、この混合物を加熱下に攪拌しながら溶解した。最終的溶液は、110μl中ゴセレリン3.50mgを含有していた。

処方物3

処方物2について上記した方法を、ラクチド／グリコリドコポリマー2.1gおよびゴセレリンアセテート1.0g(ゴセレリン0.9gと等量)を使用することにより繰り返した。この凍結乾燥した固体の酢酸含量をガスクロマトグラフィーによって測定し、かつ1.14%であることを見い出し、最終的生成物のゴセレリン含量は、28.91w/w%であった。

このゴセレリンーラクチド／グリコリドコポリマー混合物(0.36g)を安息香酸ベンジル(2.64ml、99%、Janssenによる)に添加し、この混合物を加熱下に攪拌しながら溶解した。最終的溶液は、110μl中ゴセレリン3

. 47 mg を含有していた。

処方物 4

処方物 1 について上記した方法を、1 個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー (95/5) (8.66 g、分子量 = 5604、多分散度 = 1.71、末端基の滴定による分子量 = 1960 g/mol、クロロホルム中の 1w/v % での固有粘度 = 0.094 dl/g) およびゴセレリンアセテート 1.08 g (ゴセレリン 0.96 g と等量) を使用することにより繰り返した。この凍結乾燥した固体の酢酸含量をガスクロマトグラフィーによって測定し、かつ 0.08 % であることを見い出し、最終的生成物のゴセレリン含量は、9.90 w/w % であった。

このゴセレリン－ラクチド／グリコリドコポリマー

混合物 (1.0 g) を安息香酸ベンジル (2.0 ml、99%、Janssen による) に添加し、この混合物を加熱下に攪拌しながら溶解した。最終的溶液は、110 μl 中ゴセレリン 3.67 mg を含有していた。

生物学的評価

処方物 1 ~ 4 を、例 16 の記載と同様に、ラット 1 匹当たりゴセレリン 3.6 mg の投与量で規則的発情周期の雌のラットの群 (n = 9 または 10) に投与した。投与に引き続き、これらの動物はゴセレリンの連続的放出を示す連続的間発情期に入ることが見い出された。それぞれのラット群の間発情期の平均的期間は、次表中に記載されている。この表から、3 つの全処方物により、約 3 ヶ月またはそれ以上のゴセレリン放出期間を生じたことを認めることができる。

処方物の番号	間発情期の平均的期間 (日) (± 標準誤差)
1	114 ± 1.8
2	94 ± 4.6
3	97 ± 5.3
4	83 ± 4.3

更に、これらの例から、薬ポリエステル塩の処方物を細いゲージの針を有する注射器を用いて直ちに腸管外投与することができる溶液として供給することができる。

き、かつこのような処方物はヒトのホルモン依存性腫瘍の治療に有用であることを認めることができる。

例 1 9

例 1 6 のゴセレリン一ポリエステル塩 (i i) (3. 75 g) を、先に 0. 45 μ m のフィルタを通して濾過したジクロロメタン (50 ml) に溶解した。この溶液を、オートクレーブを用いて滅菌したフラスコ中に 0. 5 μ m のテフロン製濾過膜 (Whatman WTP) を通して濾過した。溶剤を回転蒸発器を用いて除去し、粘稠な液体を生じ、次に空気を 0. 5 μ m のフィルタを通して回転蒸発器に供給した。粘稠な液体を加熱し、かつ真空下に乾燥し、白色のフォームを生じた。得られたフォームを層流キャビネット中のオートクレーブ処理したクリンプトップで密閉したバイアル中に秤量して供給し、新しく蒸留した溶剤を添加し、本質的に粒子を含まないゴセレリン一ポリエステルの処方物を生じた。

処方物 1

固体 1 g を安息香酸ベンジル (蒸留した、0. 3 mb での沸点 106 °C、3 ml) に添加し、かつ溶解するまでホットエアガンを用いて加熱した。この溶液の処方物 145 μ l は、ゴセレリン 3. 6 ml を含有していた。

処方物 2

固体 1 g をベンジルアルコール (蒸留した、0. 3 mb での沸点 44 °C、1. 7 ml) に添加し、かつ溶解するまでホットエアガンを用いて加熱した。この溶液の処方物 100 μ l は、ゴセレリン 3. 6 ml を含有していた。

10 匹の雌のラットの 2 つの群を、ラット 1 匹当たり 3. 6 mg の投与量で処方物 1 および 2 を用いて 20 ゲージの針を有する注射器を用いて皮下投与した。末端の血液試料をその後の時点 (1 週間後 ($n = 4$)、4 週間後および 6 週間後 ($n = 3$)) でラットから採取した。血液試料をラジオイムノアッセイを用いてゴ

セレリンについて検定した。ゴセレリンの測定可能な血液濃度を2つの処方物を用いて測定し、これによれば、溶液処方物は数週間で確認される薬放出量を生じることを示した。処方物の血液濃度のプロフィールは、約4週間でピークに達することが測定されたが、しかし、処方物2を用いた場合には、ピークは1週間で起こり、その後に血液濃度は、やがて次第に減少することが測定された処方物1の血液濃度のプロフィールは、安息香酸ベンジルを溶液処方物の溶剤として使用する場合に得られたより一定の血液濃度に基づき処方物2の場合よりも望ましいことが考えられる。

更に、これらの例から、薬ポリエステル塩の処方物は、細いゲージの針を有する注射器を使用することにより直ちに腸管外投与することができる溶液として供給することができ、かつこのような処方物は、ヒトの

ホルモン依存性腫瘍の治療に有用であることを認めることができる。

例20

1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー(95/5)(9.0g、分子量=6011、多分散度=1.56、末端基の滴定による分子量=2700g/mol、クロロホルム中の1w/v%での固有粘度=0.099dl/g)をジクロロメタン(100ml)に溶解した。この溶液にゴセレリンアセテート(1.124g、ゴセレリン1gと等量)を攪拌しながら添加し、引続きメタノール(10ml)を添加した。得られた曇った懸濁液を、澄明な溶液が得られるまで室温で約1時間攪拌した。溶剤を回転蒸発器を使用することにより除去し、澄明な粘稠の液体を生じた。次に、この液体をジクロロメタンに再溶解し、かつ前記と同様に再乾燥した。この過程を2回以上繰り返し、最終的に得られた粘稠な液体を高真空中に乾燥し、白色のフォームを得、これをさらに一晩中真空乾燥した。フォームを破壊して微細な粉末にし、この粉末を室温で1日間真空乾燥した。この粉末に安息香酸ベンジル(20ml、99%、Janssenによる)を添加し、生じる混合物を攪拌しながら温和に加熱し、溶液を得た。

生物学的評価

このゴセレリンの溶液処方物を20ゲージの針を有

する注射器を用いてそれぞれ45匹の雌のラットに皮下投与した（ $220\mu l$ 、ゴセレリン7.3mgと等量）。5つのラットの群に境界を作り、血液試料を1日目および4日目、ならびに1週間目、3週間目、5週間目、7週間目、9週間目、11週間目および13週間に採取した。更に、血液試料を2週間目、4週間目、6週間目、8週間目、10週間目および12週間に5つのラットの群の尾の静脈から採取した。試料をラジオイムノアッセイを用いてゴセレリンについて分析し、この結果、ゴセレリン-ポリエステル塩の液体処方物により、投与の約11週間後に薬の測定可能な血液濃度が生じることが判明し、かつ処方物により生体内で確認されたゴセレリンの放出量が生じることが判明した。

更に、これらの例から、薬ポリエステル塩の処方物を細いゲージの針を有する注射器を用いて直ちに腸管外投与することができる溶液として供給することができ、かつこのような処方物はヒトのホルモン依存性腫瘍の治療に有用であることを認めることができる。

例21

サブスタンスPとして、酢酸塩の形で知られたペプチド（Sigmaによる、2mg）をジクロロメタン（3ml）に添加し、かつ十分に攪拌した。このペプチドは、溶剤への溶解の徴候を示さず、かつ曇った懸濁液としてのままであった。

1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー（70/30）（225mg、分子量=9755、多分散度=1.52、末端基の滴定による分子量=1800）をジクロロメタン（25ml）に添加した。この溶液を15分間攪拌し、澄明な無色の溶液を生じた。この溶液にメタノール（0.5ml）中のサブスタンスP（25mg）の溶液を添加した。生じる曇った懸濁液を、完全に澄明な溶液が形成されるまでの1時間攪拌した。溶剤を回転蒸発によって除去し、得られた澄明な“ガラス状の”固体をジクロロメタン（5ml）に再溶解し、かつ再蒸発させた。この処理を2回繰り返した。最終的に固体をジクロロメタン（3ml）に溶解し、この溶液をPTFEで被覆した布の上に徐々に滴下し、溶剤を蒸発させ、澄明な無色のガラス状の固体の薄膜を形成させた（ペプチド含量9.1w/v%）。

この薄膜（96.8 mg）を小型のバイアル中に置き、磷酸塩緩衝したサリン（2 ml、pH 7.4）を添加した（この場合、緩衝液は、0.2 μmのフィルタを通して予め濾過させ、かつ保存剤としてのナトリウムアジド0.02%を含有していた）。バイアルを37℃で恒温器中に置き、緩衝液を除去し、かつ周期的に代替した。除去した緩衝液をサブスタンスPの標準溶液に対して紫外線分光光度計（Hewlett Packard 8452A）を210 nmで使用することによりサブスタンスPの放出

量を分析した。この結果は、サブスタンスPを、カルボキシ末端基を有するラクチド／グリコリドコポリマーの塩として形成させた場合にジクロロメタンに溶解することができ、かつこの溶剤の場合に処理することができ、薄膜を生じ、この薄膜は、約4週間でペプチドの連続的放出を生じることを示す。

例 2 2

ロイプロリドアセテート（換言すれば、ロイプロレリンアセテートとして知られている）の水溶液（330 mg/m1の溶液300 μl）を高い剪断条件下に、ミグリオール（Miglyol）810（リノレン酸を含む中位の鎖長の飽和脂肪酸のトリグリセリド、Dynamit Nobel, UKによる）中の約2000の数平均分子量を有するポリ（ヒドロキシステアリン酸）の10w/w%溶液20 mlに添加し、油／水の界面で部分的にロイコプロリドーポリマー塩を形成させ、この場合この塩は、生じる油中水型のコロイド状懸濁液を安定化させる。水を、この混合物がもはや泡立たずかつ気泡を形成しなくなるまで、高真空中に攪拌することによって50℃で除去し、著しい曇り度を示しかつ経口投与に適した油状組成物を生じた。

例 2 3

Lys⁸-バソプレッシン酢酸塩（2 mg、Sigmaによる）をジクロロメタン（3 ml）に添加し、かつ攪拌した。このペプチドは、溶剤への溶解の徵候を示さ

ず、かつ曇った懸濁液としてのままであった。

1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー (70/30) (225 mg、分子量 = 9755、多分散度 = 1.52、末端基の滴定による分子量 = 1800) をジクロロメタン (5 ml) に添加した。この混合物を15分間攪拌し、澄明な無色の溶液を生じた。この溶液に Ly s^8 -バソプレッシン (25 mg、Sigmaによる) およびメタノール (0.5 ml) を添加した。生じる曇った懸濁液を、完全に澄明な溶液が形成されるまでの1時間攪拌した。溶剤を回転蒸発によって除去し、得られた澄明な“ガラス状の”固体をジクロロメタン (5 ml) に再溶解し、かつ再蒸発させた。この処理を2回繰り返した。最終的に固体をジクロロメタン (3 ml) に溶解し、この溶液を PTFE で被覆した布の上に徐々に滴下し、溶剤を蒸発させ、澄明な無色のガラス状の固体の薄膜を形成させた (Ly s^8 -バソプレッシン含量 10 w/v %)。

この薄膜 (97.31 mg) を小型のバイアル中に置き、磷酸塩緩衝したサリン (2 ml、pH 7.4) を添加した (この場合、緩衝液は、0.2 μm のフィルタを通して予め濾過させ、かつ保存剤としてのナトリウムアジド 0.02% を含有していた)。バイアルを 37°C で恒温器中に置き、緩衝液を除去し、かつ周期的に代替した。この緩衝液を Ly s^8 -バソプレッシンの標準溶液に対して紫外線分光光度計 (Hewlett Packard 84

52A) を 210 nm で使用することにより Ly s^8 -バソプレッシンの放出量を分析した。この試験の結果は、次表中に示されている。この実験は、 Ly s^8 -バソプレッシンを、カルボキシ末端基を有するラクチド／グリコリドコポリマーの塩として形成させた場合にジクロロメタンに溶解することができ、かつ生じる混合物は、少なくとも 4 週間でペプチドの連続的放出を生じることを示す。

試験管内での Ly s^8 -バソプレッシンの放出量

時 間 (日 数)	薄膜からの Lys-ペソプレッシンの放出量 (%)
1	4 . 1 1
4	5 . 4 5
7	5 . 5 5
1 4	5 . 7 5
2 1	2 6 . 8 2
2 8	4 7 . 2 7

例 2 4

ラクチド／グリコリドコポリマー中のZENECA ZD6003（欧州特許第0473268号明細書

の参考例4または7に記載されたようなポリエチレングリコール5000で変性された[Met¹, Arg¹¹, Ser^{17, 27, 60, 65}]ヒトG-CSF（顆粒細胞コロニー刺激因子）の2つの処方物を次のようにして得た。

(i) ジクロロメタン(4ml)をZD6003(39.72mg)の凍結乾燥した調製物に添加した。この結果、溶剤中の薬の不透明な分散液を生じた。1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー(75/25)(363.6mg、分子量=9963、多分散度=2.19、末端基の滴定による分子量=2815)を添加し、澄明な溶液を形成した。

この溶液を剪断下(2150rpm、Heidolph RZR50攪拌機)で水中のメチルセルロース(Methocel 0.25w/v%、15MPa.s、Flukaによる)の溶液に添加した。この速度で3分間の攪拌後、攪拌速度を800rpmに減少させた。次に、生じる粒子を重力の下で30分間沈積させ、この溶液を氷上で冷却したまま保持した。次に、上澄み液を廃棄し、粒子を氷冷却した蒸留水(50ml)中に再懸濁させることによって洗浄し、かつ1000rpmで遠心分離した

。この処理を4回繰り返し、次に粒子を最終的に凍結乾燥した。

こうして得られた粒子は、良好な性質を有し、球状であり、かつ光学顕微鏡による画像分析によって測定されるように $32\text{ }\mu\text{m}$ の平均粒径を有していた。この

粒子の薬含量を抽出およびHPLC分析によって測定し、9.45%であることを見い出し、この場合この値は、微粒子を形成させるために使用された薬の配合効率が96%であることを表わす。

(ii) ジクロロメタン(4ml)をZD6003(44.18mg)の凍結乾燥した調製物に添加した。この結果、溶剤中の薬の不透明な分散液を生じた。ラクチド／グリコリドコポリマー(75/25、364.1mg、サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量=16800、多分散度=2.2、Boehringer Ingelheimによる)を添加した。末端基の滴定によるポリマーの分子量の測定を実施したが、しかし、この測定は滴定可能な部分の濃度が著しく低いので不可能であり、したがってこのポリマーは、末端カルボン酸基を有していない。薬溶液とポリマーとの混合物は、混濁分散液として残存したポリマーおよび混合物の添加下に澄明にならず、このことは、予想したように、ポリマー中の酸末端基の不在下にペプチド－ポリエステル塩が形成し得なかつことを示す。

この混合物を剪断下(2150 rpm、Heidolph RZR50攪拌機)で水中のメチルセルロース(Methocel 0.25w/v%、15mPa.s、Flukaによる)の溶液に添加した。この速度で3分間の攪拌後、攪拌速度を800 rpmに減少させた。次に、生じる粒子を重力の下で30分間沈積させ、この溶液を氷上で冷却した

まま保持した。次に、上澄み液を廃棄し、粒子を蒸留水(50ml)中に再懸濁させることによって洗浄し、かつ1000 rpmで遠心分離した。この処理を4回繰り返し、次に粒子を最終的に凍結乾燥した。

こうして得られた粒子は、上記の(i)で得られたものと比較して劣った性質を有しており、この場合幾つかのものは、不規則な形状を有し、かつ光学顕微鏡による画像分析によって測定されるように $40\text{ }\mu\text{m}$ の平均粒径を有していた。こ

の粒子の薬含量を抽出およびHPLC分析によって測定し、2.05%であることを見い出し、この場合この値は、微粒子を形成するために使用された薬の配合効率が19%であることを表わす。

上記の例は、ジクロロメタンそれ自体が薬に対する非溶剤であるにも拘わらず、ZD6003を1個の末端カルボン酸基を有するポリマーの存在下の場合にジクロロメタンに溶解することができる事を示す。更に、このような溶液は、薬の極めて高い配合速度で薬およびポリマーの微粒子を形成するために使用することができる。これに対して、また、上記例は、このようなポリマーが末端カルボン酸基を有さずかつ曇った分散液をのみを形成させる場合には、ZD6003をポリマーの存在下にジクロロメタンに溶解させることができないことを示す。更に、末端カルボン酸基を有しないポリマーの溶液中のZD6003のかかる曇

った分散液は、微粒子を形成するために処理した場合には、薬の僅かな均質混合を生じる。

例25

(i) ゴセレリンアセテート (22.47mg、ゴセレリン19.99mgと等量) を安息香酸ベンジル (2.21g、99%、Janssenによる) に添加した。この混合物を40℃で恒温器中に置き、かつ電磁攪拌機を用いて9日間連続的に攪拌した。2日後および9日後に、アリコートを取り、13000rpmで15分間遠心分離し、溶解しない薬をペレット状にした。上澄み液のアリコート (約100mg) を50mlの容積のフラスコ中に正確に秤量して供給した。各アリコートに冰酢酸 (2ml) を添加し、引き続きトリフルオロ酢酸 (0.5v/v%) の水溶液で充填させた。この溶液の一部を遠心分離管中に置き、13000rpmで15分間遠心分離し、懸濁物質を分離した。次に、上澄み液をHPLCを用いてゴセレリン含量について評価した。ゴセレリンは、それぞれの試料の場合に検出不可能であった。このHPLC検定におけるゴセレリン検出の限界は、0.2μg/mlであり、定量化の限界は、0.5μg/mlであった。従って、安息香酸ベンジル中のゴセレリンの平行溶解度 (40℃で) は、上記の記載から0.2μg/mlである旨、評価することができる。

の粒子の薬含量を抽出およびHPLC分析によって測定し、2.05%であることを見い出し、この場合この値は、微粒子を形成するために使用された薬の配合効率が19%であることを表わす。

上記の例は、ジクロロメタンそれ自体が薬に対する非溶剤であるにも拘わらず、ZD6003を1個の末端カルボン酸基を有するポリマーの存在下の場合にジクロロメタンに溶解することができることを示す。更に、このような溶液は、薬の極めて高い配合速度で薬およびポリマーの微粒子を形成するために使用することができる。これに対して、また、上記例は、このようなポリマーが末端カルボン酸基を有さずかつ曇った分散液をのみを形成させる場合には、ZD6003をポリマーの存在下にジクロロメタンに溶解させることができないことを示す。更に、末端カルボン酸基を有しないポリマーの溶液中のZD6003のかかる曇

った分散液は、微粒子を形成するために処理した場合には、薬の僅かな均質混合を生じる。

例25

(i) ゴセレリンアセテート (22.47mg、ゴセレリン19.99mgと等量) を安息香酸ベンジル (2.21g、99%、Janssenによる) に添加した。この混合物を40℃で恒温器中に置き、かつ電磁攪拌機を用いて9日間連続的に攪拌した。2日後および9日後に、アリコートを取り、13000rpmで15分間遠心分離し、溶解しない薬をペレット状にした。上澄み液のアリコート (約100mg) を50mlの容積のフラスコ中に正確に秤量して供給した。各アリコートに氷酢酸 (2ml) を添加し、引き続きトリフルオロ酢酸 (0.5v/v%) の水溶液で充填させた。この溶液の一部を遠心分離管中に置き、13000rpmで15分間遠心分離し、懸濁物質を分離した。次に、上澄み液をHPLCを用いてゴセレリン含量について評価した。ゴセレリンは、それぞれの試料の場合に検出不可能であった。このHPLC検定におけるゴセレリン検出の限界は、0.2μg/mlであり、定量化の限界は、0.5μg/mlであった。従って、安息香酸ベンジル中のゴセレリンの平行溶解度 (40℃で) は、上記の記載から0.2μg/mlである旨、評価することができる。

(i i) 1個の末端カルボン酸基を有するラクチド／

グリコリドコポリマー (95/5 (291.9 mg、分子量 = 6742、多分散度 = 1.61、末端基の滴定による分子量 = 2565 g/mol、クロロホルム中の 1w/v%での固有粘度 = 0.103 dl/g) を安息香酸ベンジル (3.38 g、99%、Janssenによる) に添加し、溶液を形成させた。この溶液にゴセレリンアセテート (22.52 mg、ゴセレリン 20.03 mg と等量) を添加した。この混合物を恒温保持し、かつ上記 (i) の記載と同様にして試料採取した。2日間に安息香酸ベンジル中にゴセレリンを検出することができなかつたが、しかし、9日間で安息香酸ベンジル 1 mg 当たりゴセレリン約 0.2 μg の濃度を検出した。この HPLC 検定におけるゴセレリン検出の限界は、上記 (i) に記載された通りであった。このことから、ラクチド／グリコリドコポリマーとの 1 個の混合物として存在する場合には、安息香酸ベンジル中のゴセレリンの平衡溶解度 (40°C) は、0.2~0.5 μg/mg として評価することができるこことを示すことができる。

(i i i) 1 個の末端カルボン酸基を有するラクチド／グリコリドコポリマー (95/5) (9.0 g、分子量 = 6011、多分散度 = 1.56、末端基の滴定による分子量 = 2700 g/mol、クロロホルム中の 1w/v%での固有粘度 = 0.099 dl/g) をジクロロメタン (100 ml) に添加した。この溶液にゴセレリ

ンアセテート (1.124 g、ゴセレリン 1 g と等量) を攪拌しながら添加し、引続きメタノール (10 ml) を添加した。得られた曇った懸濁液を澄明溶液が得られるまで室温で約 1 時間攪拌した。溶剤を回転蒸発器を用いて除去し、澄明な粘稠の液体を生じた。次に、この液体をジクロロメタンに再溶解し、かつ前記と同様に再乾燥した。次に、この工程を 2 回以上繰り返し、得られた微細な粘稠の液体を高真空中に乾燥し、白色のフォームを生じさせ、さらに一晩中真空乾燥した。このフォームを破壊して微細な粉末にし、この粉末を室温で 1 日間真空乾燥した。この粉末に安息香酸ベンジル (20 ml、Janssenによる) を添加し、

生じる混合物を攪拌しながら温和に加熱し、溶液を得た。

この溶液を十分に混合し、1mlの試料を遠心分離器中に置き、かつ1400 rpmで30分間回転させた。上澄み液のアリコートを注意深く除去し、50 mlの容積のフラスコ中に秤量して供給した。この試料を前記(i)の記載と同様にしてゴセレリン含量について検定した。この溶液のゴセレリン含量は、安息香酸ベンジル24.6 μg/mgであることが見い出された。

この例は、安息香酸ベンジルがゴセレリンアセテートにとって極めて不十分な溶剤であることを示す。更に、安息香酸ベンジル中のゴセレリンアセテートとの簡単な混合物を形成させるためのラクチド／グリコリ

ドポリマーの添加により、安息香酸ベンジル中のゴセレリンアセテートの平衡溶解度は、顕著には増大しないことを導く。しかし、ゴセレリン／ポリエステル塩は、安息香酸ベンジルに溶解することができ、この溶剤中の遊離ゴセレリンの評価される平衡溶解度よりも著しく高い濃度でゴセレリンを含有する溶液を形成する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 93/01079

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ^a		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. 5 A61K47/48; A61K9/20; A61K9/16		
II. FIELDS SEARCHED Mishima Documentation Searched ^b		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. 5	A61K	
Documentation Searched other than Mishima Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ^c		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT^d		
Category ^e	Citation of Document, if with indication, where appropriate, of the relevant passages ^f	Relevant to Claim No. ^g
X	EP,A,0 350 246 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 10 January 1990 see abstract see page 2, line 37 - page 3, line 2 see page 3, line 42 - page 4, line 25 see page 5, line 30 - line 34 see page 6, line 8 - line 16; claims; example 1 ---	1-4,6-7
X	PROCEED. INTERN. SYMP. CONTROL. REL. BIOACT. MATER. vol. 14, 1987, pages 99 - 100 J.R. LAWTER ET AL. 'DRUG RELEASE FROM POLY (GLYCOLIDE-CO-DL-LACTIDE) MICROCAPSULES' cited in the application see the whole document ---	1-4,6-7 -/-
<p>^a Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>^b "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>^c "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>^d "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>^e "a" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search 03 SEPTEMBER 1993	Date of Mailing of this International Search Report 16.09.93	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer HOFF P.J.	

PCT/GB 93/01079

International Application No.

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	PHARMACEUTICAL RESEARCH vol. 8, no. 5, 1991, pages 584 - 587 H. OKADA ET AL. 'SUSTAINED PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES IN RATS FOLLOWING SINGLE AND REPEATED ADMINISTRATION OF ONCE-A-MONTH INJECTABLE MICROSPHERES OF LEUPROLIDE ACETATE' cited in the application see the whole document ---	1-4, 6-7
Y	EP,A,0 058 481 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 25 August 1982 cited in the application see abstract see page 4, line 17 - page 5, line 18 see page 7, line 5 - line 12 see page 18, line 20 - line 23; claims ---	1-13
Y	US,A,4 997 643 (PARTAIN ET AL.) 5 March 1991 see abstract see column 6, line 33 - column 7, line 62; claims ---	1-13
Y	EP,A,0 467 389 (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION) 22 January 1992 see abstract see page 4, line 53 - page 5, line 6 see page 5, line 24 - line 44 see page 6, line 19 - line 56 see page 8, line 14 - line 27; claims; examples 1-2,5 ---	1-13
A	EP,A,0 052 510 (SYNTEX INC.) 26 May 1982 cited in the application see abstract; claims ---	1-13
A	ZIEKENHUISFARMACIE vol. 4, no. 2, 1988, pages 54 - 56 F.G. HUTCHINSON ET AL. 'BIODEGRADABLE POLYMERS FOR THE DELIVERY OF POLYPEPTIDES AND PROTEINS' see the whole document -----	1-13

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

GB 9301079
SA 74393

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EPO file no
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 03/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0350246	10-01-90	JP-A-	2124814	14-05-90
EP-A-0058481	25-08-82	AU-A- AU-B- AU-A- AU-B- AU-A- CA-A- JP-B- JP-A- JP-C- JP-B- JP-A- US-A, B US-A-	2840789 582920 6498886 560829 7998682 1169090 1057098 57150609 1744093 3001330 62064824 4767628 5004602	04-05-89 13-04-89 19-02-87 16-04-87 26-08-82 12-06-84 04-12-89 17-09-82 25-03-93 10-01-91 23-03-87 30-08-88 02-04-91
US-A-4997643	05-03-91	CA-A-	2020966	13-01-91
EP-A-0467389	22-01-92	AU-A- CA-A- JP-A-	8046691 2046830 5103838	23-01-92 20-01-92 27-04-93
EP-A-0052510	26-05-82	AU-B- AU-A- CA-A- JP-B- JP-A- US-A-	556754 7756081 1176565 4040329 57118512 4675189	20-11-86 27-05-82 23-10-84 02-07-92 23-07-82 23-06-87

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号 廣内整理番号 F I

A 61 K	38/04		
	38/11		
	38/17		
	38/21		
	38/22		
	38/23		
	38/24		
	38/26		
	38/28		
	38/35		
	38/43		
	38/46		
	38/48		
	47/48	C 7433-4C	
		9455-4C	A 61 K 37/24
		9455-4C	37/38
		9455-4C	37/43
		9455-4C	37/26
		9455-4C	37/28
		9455-4C	37/66
		9455-4C	37/30
		9455-4C	37/40
		9455-4C	37/42
		9455-4C	37/54
		9455-4C	37/553
		9455-4C	37/465

(81) 指定国 OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA